

STELLA MARIS TESSARO FIGURA KURTZ

**MARACUJÁ:**  
**FARMACOGNOSE DAS FOLHAS DE *Passiflora actinia* Hooker E**  
**ESTUDO PRELIMINAR DE FORMULAÇÃO PARA INCORPORAR A TINTURA**  
**DE *Passiflora alata* Dryander, PASSIFLORACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas – Área Insumos, medicamentos e  
correlatos, Setor de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes  
Santos

Co-orientadores: Prof.<sup>a</sup> Márcia do Rocio Duarte  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mayumi Elisa Otsuka  
Sato

CURITIBA  
2001

**STELLA MARIS TESSARO FIGURA KURTZ**

**MARACUJÁ:  
FARMACOGNOSE DAS FOLHAS DE *Passiflora actinia* Hooker E  
ESTUDO PRELIMINAR DE FORMULAÇÃO PARA INCORPORAR A TINTURA DE  
*Passiflora alata* Dryander, PASSIFLORACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Área Insumos, medicamentos e correlatos, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador:

Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos

Co-orientadores:

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia do Rocio Duarte

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mayumi Elisa Otsuka Sato

**Curitiba  
2001**

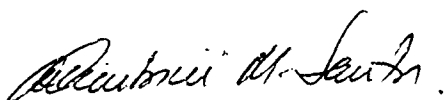


**"MARACUJÁ: FARMACOGNOSE DAS FOLHAS DE *PASSIFLORA ACTINIA* HOOKER E ESTUDO PRELIMINAR DE FORMULAÇÃO PARA INCORPORAR A TINTURA DE *PASSIFLORA ALATA* DRYANDER, PASSIFLORACEAE".**

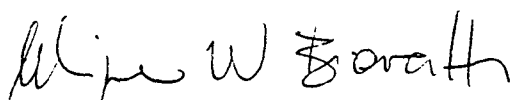
por

***Stella Maris Tessaro Figura Kurtz***

Dissertação aprovada como requisito parcial  
para obtenção do grau de mestre no Programa de  
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela Comissão  
Examinadora



Prof. Dr. Cid Aimbiré M. Santos (Orientador/Presidente)



Profª. Dra. Maique Weber Biavatti ( UNIVALI)



Profª. Dra. Sandra Mara W. Barreira (UFPR)

Curitiba, 6 de dezembro de 2001

## NOTA BIOGRÁFICA

---

A autora graduou-se em Farmácia Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná em 1995. Em seguida atuou como Farmacêutica Bioquímica até 1998, no laboratório de análises clínicas Paraná Clínicas, e, simultaneamente, entre 1996-1997, exerceu a função de Farmacêutico Militar, no Hospital Geral de Curitiba. No último ano citado, ingressou no laboratório CENDILAB, análises clínicas, onde foi responsável pelo setor laboratorial de Hormônios e Imunologia Clínica, até o ano de 1999, quando foi aprovada no concurso público da Prefeitura Municipal de São José dos Pinhais, para ocupar o cargo de farmacêutica responsável pela Farmácia Básica do município, estando, nesse período, exercendo a função de Farmacêutica Bioquímica no laboratório LABAC - CEDIMEN, até o ano de 2000. Sendo neste ano citado, aprovada no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Insumos, medicamentos e correlatos da mesma Universidade, onde desenvolveu um trabalho relacionado com duas espécies de maracujá, cujos resultados estão contidos nesta dissertação. Neste período, apresentou o trabalho S. M. T. F. Kurtz; M. E. O. Sato; M. R. Duarte; C. A. M. Santos, Caracterização morfo-anatômica e dos compostos alcaloídicos do maracujá - *Passiflora actinia* Hook., Passifloraceae, Livro de Resumos, III Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, setembro/2001, Curitiba, PR, FB - 29.

# DEDICATÓRIA

---

Ao meu esposo Marcelo,  
pelo amor e compreensão conferidos

## AGRADECIMENTOS

---

Ao Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos pela confiança, dedicação, capacidade e liderança demonstrados diariamente;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia do Rocio Duarte pela seriedade e sensatez apresentadas durante a elaboração das etapas;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mayumi Elisa Otsuka Sato pelo empenho, amizade e determinação com que acompanhou o progresso deste trabalho;

Ao Centro de Microscopia Eletrônica deste estabelecimento de ensino, o qual permitiu a realização das fotografias de microscopia eletrônica de varredura, presentes no trabalho;

Ao Prof. Dr. Olavo Guimarães pela identificação taxonômica e ao Prof. Dr. Paulo Chancel Deodado de Freitas, Universidade de São Paulo, pelo fornecimento dos padrões dos alcalóides.

Aos professores e funcionários da Universidade do Vale do Itajaí, que disponibilizaram o aparelho para as análises em CLAE, além de terem auxiliado na realização das mesmas;

Aos funcionários do Laboratório de Controle de Qualidade e do Laboratório Industrial - Farmácia Escola, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, pela contribuição no desenvolvimento tecnológico da formulação;

Aos colegas do laboratório de Farmacognosia, Márcia, Wesley, Patrícia, Cátia, Tatiana, Carina, Kely, Jane e Everson, pelo bom convívio. Em especial, à senhora Maria do Rocio Baldon Reis que auxiliou durante as realizações experimentais, sempre disposta a ajudar;

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo companheirismo, em especial ao colega João Luiz de Souza, pelo auxílio no desenvolvimento de ensaios;

A todos que colaboraram para a elaboração deste trabalho;

Aos familiares que apoiaram e entenderam minha ausência;

E sem dúvida, tenho tudo a agradecer a Deus.

## EPÍGRAFE

---

*Não basta dar os passos que nos devem levar  
um dia ao objetivo,  
cada passo deve ser ele próprio um objetivo em si mesmo,  
ao mesmo tempo que nos leva para diante.*  
Wolfgang Von Goethe

# SUMÁRIO

---

NOTA BIOGRÁFICA .....	ii
DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS .....	iv
EPÍGRAFE.....	v
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xii
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
INTRODUÇÃO .....	1
Considerações gerais .....	5
- Posição sistemática das espécies.....	5
- Gênero <i>Passiflora</i> .....	6
- Desenvolvimento tecnológico.....	15
Objetivos .....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
Material botânico .....	27
Estudo morfo-anatômico.....	28
Estudo dos alcalóides terciários de <i>P. actinia</i> .....	29
Desenvolvimento da formulação.....	31
RESULTADOS.....	34
Estudo morfo-anatômico.....	34
- Lâmina foliar .....	37
- Nervura mediana .....	43
- Pecíolo.....	48
Desenvolvimento da formulação.....	52
- Controle farmacognóstico da droga .....	52
- Desenvolvimento tecnológico.....	52

- Estabilidade física .....	53
- Estabilidade microbiológica .....	56
DISCUSSÃO .....	57
Estudo morfo-anatômico .....	57
- Estudo morfológico externo .....	57
- Estudo anatômico .....	58
☐- Lâmina foliar .....	58
☐- Nervura mediana .....	60
☐- Pecíolo .....	61
Estudo dos alcalóides terciários de <i>P. actinia</i> .....	63
Desenvolvimento da formulação .....	72
CONCLUSÃO .....	86
Estudo morfo-anatômico .....	86
Estudo dos alcalóides terciários de <i>P. actinia</i> .....	87
Desenvolvimento da formulação .....	88
REFERÊNCIAS .....	89

## LISTA DE FIGURAS

---

1. <i>P. actinia</i> , evidenciando a flor.....	07
2. <i>P. actinia</i> , detalhe dos frutos .....	07
3. <i>Passiflora actinia</i> Hook., Passifloraceae. Aspecto geral, evidenciando o hábito escandente.....	35
4. <i>P. actinia</i> , detalhe do ramo foliar florido.....	35
5. <i>P. actinia</i> , respectivas faces adaxial e abaxial mostrando os nectários (setas).....	35
6. Nectário extrafloral, localizado no pecíolo (MEV 51x).....	36
7. Nectário do pecíolo (MEV 58x).....	36
8. Nectário do pecíolo (MEV 70x).....	37
9. <i>P. actinia</i> , vista frontal das células epidérmicas da face adaxial, indicando o formato sinuoso na região internervural e poligonal sobre as nervuras (setas).....	38
10. <i>P. actinia</i> , vista frontal das células epidérmicas da face abaxial, mostrando o formato sinuoso e o aspecto papiloso, e estômatos anomocíticos.....	38
11. <i>P. actinia</i> , vista frontal da epiderme foliar, face adaxial, mostrando cera epicuticular (MEV 675x).....	39
12. <i>P. actinia</i> , vista frontal da epiderme foliar, face abaxial, evidenciando cera epicuticular, com aspecto de pequenas escamas (MEV 675x). .....	39
13. Detalhe da figura anterior (MEV 1597x).....	40
14. <i>P. actinia</i> , secção transversal da lâmina foliar, onde são observados estômatos na face abaxial, inseridos no mesmo nível das demais células epidérmicas (seta).....	40
15. <i>P. actinia</i> , secção transversal da lâmina foliar, destacando a epiderme uniestratificada e um feixe vascular de pequeno porte circundado por	



bainha parenquimática e apresentando calota de fibras perivasculares aposta ao floema.....	41
16. <i>P. actinia</i> , secção transversal da lâmina foliar, onde se notam o mesofilo dorsiventral e idioblasto contendo drusa de oxalato de cálcio (seta).....	42
17. <i>P. actinia</i> , vista frontal do limbo mostrando a nervação foliar constituída por feixes vasculares envoltos por bainha cristalífera..... .....	43
18. <i>P. actinia</i> , secção transversal da nervura mediana, evidenciando o formato biconvexo mais proeminente na face abaxia.....	44
19. <i>P. actinia</i> , secção transversal da nervura mediana, destacando o colênquima angular e feixes vasculares estabelecendo uma região medular levemente lignificada.....	45
20. <i>P. actinia</i> , vista frontal da epiderme foliar sobre a nervura mediana, revelando a presença de cera epicuticular (MEV 675x).....	46
21. <i>P. actinia</i> , secção transversal da nervura mediana junto à face adaxial, evidenciando colênquima angular e idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio.....	46
22. <i>P. actinia</i> , secção transversal da nervura mediana, face abaxial, onde se notam colênquima angular e idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio.....	47
23. <i>P. actinia</i> , detalhe do feixe vascular da nervura mediana, em secção transversal, observando-se o xilema, a zona cambial e a calota de fibras perivasculares aposta ao floema.....	47
24. <i>P. actinia</i> , secção transversal do pecíolo, que apresenta o formato praticamente arredondado, sendo levemente achatado na face adaxial (seta).....	48
25. <i>P. actinia</i> , pormenor da foto anterior, destacando colênquima angular, idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio, feixes vasculares colaterais e bainha amilífera (seta).....	49
26. <i>P. actinia</i> , secção transversal do pecíolo, indicando a cutícula relativamente espessada e estriada, o colênquima angular e idioblasto	

contendo drusa de oxalato de cálcio.....	49
27. <i>P. actinia</i> , secção transversal do pecíolo, caracterizando a cutícula relativamente espessada após reação com Sudam III e idioblasto contendo drusa de oxalato de cálcio.....	50
28. <i>P. actinia</i> , secção transversal do pecíolo onde se observam idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio.....	51
29. <i>P. actinia</i> , secção transversal do pecíolo, destacando a presença de amiloplastos que constituem uma bainha amilífera, evidenciados pela reação com glicerina iodada (seta).....	51
30. Valores médios de viscosidade aparente em amostras de elixir de maracujá.....	55
31. Valores médios de pH em amostras de elixir de maracujá.....	55
32. Diferença visual na quantidade de precipitado frente ao reativo de Dragendorff entre as reações 1, 2, 3 e 4 .....	67
33. Detalhe da diferença visual na quantidade de precipitado frente ao reativo de Dragendorff entre as reações 3 (com aquecimento) e 4 (sem aquecimento).....	67
34. Tempo de retenção em CLAE apresentado pelos padrões de alcalóides $\beta$ -carbolínicos.....	68
35. Comparação entre os cromatogramas em CLAE e espectro de UV do padrão de harmana e o composto com tempo de retenção em 15 min .....	70
36. Cromatograma em CLAE co-adição do padrão de harmana com a fração de alcalóides 48-79 .....	71
37. Perfil cromatográfico da tintura de maracujá, seguido ao preparo... ..	78
38. Perfil cromatográfico do elixir de maracujá, seguido ao preparo.....	79
39. Perfil cromatográfico do elixir de maracujá, após quatro meses, à temperatura ambiente.....	82
40. Perfil cromatográfico do elixir de maracujá, após oitavo mês à temperatura ambiente.....	83

## LISTA DE TABELAS

---

1. Resultados dos ensaios efetuados para o controle farmacognóstico da droga.....	52
2. Resultados dos ensaios realizados para a avaliação da tintura de maracujá no tempo zero.....	52
3. Resultados dos ensaios realizados para avaliação do elixir de maracujá, no tempo zero.....	53
4. Resultados dos ensaios de viscosidade aparente seguidos à preparação do elixir, em temperatura ambiente.....	53
5. Resultados das determinações de pH e características organolépticas em temperatura ambiente, no tempo zero.....	53
6. Resultados dos ensaios de viscosidade aparente em temperaturas de 50°C e de 40°C, após a primeira e segunda semanas de armazenamento.....	53
7. Resultados das determinações de pH e características organolépticas em temperatura de 50°C e 40°C, após a primeira semana.....	54
8. Resultados da estabilidade física, em temperatura ambiente.....	54
9. Resultados do controle microbiológico do elixir no tempo zero e após oito meses de estocagem em prateleira, à temperatura ambiente, em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em 1ml de elixir.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

°C	graus Celsius
°GL	graus Gay Lussac
%	porcentagem
a. C.	antes de Cristo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHP	British Herbal Pharmacopoeia
CCD	cromatografia em camada delgada
CHCl <sub>3</sub>	clorofórmio
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
cm	centímetro
cP	centipoise
FARM. BRAS. II	Farmacopéia Brasileira 2ª edição
F. BRAS. III	Farmacopéia Brasileira 3ª edição
F. BRAS. IV	Farmacopéia Brasileira 4ª edição
g	grama
h	hora
HCl	ácido clorídrico
kg	kilograma
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
m/v	massa/volume
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfato de sódio
nm	nanômetro
O/A	óleo/água
OMS	Organização Mundial da Saúde

rpm	rotações por minuto
UFC	unidades formadoras de colônia
USP	United States Pharmacopoeia
v/v	volume/volume
WHO	World Health Organization

## RESUMO

---

O maracujá é uma espécie vegetal, cujas folhas são utilizadas como sedativo e calmante na forma de extratos, tinturas, infusos e decoctos. O presente trabalho teve por objetivo realizar o estudo morfo-anatômico e a investigação de constituintes alcaloídicos das folhas de *Passiflora actinia* Hooker, Passifloraceae. Embora essa espécie se distribua amplamente na região Sul do Brasil, nenhum trabalho relacionado à anatomia foi relatado até o presente para a mesma. A análise morfo-anatômica das folhas revelou um contorno oval, margem lisa, ápice obtuso, base arredondada e limbo inteiro. Observou-se que a face abaxial da epiderme é papilosa, o mesofilo é dorsiventral, os feixes vasculares são colaterais e idioblastos contendo drusas estão distribuídos no parênquima foliar. Análise por CLAE demonstrou a presença de traços do alcalóide harmana na fração alcaloídica, dentre os cinco principais padrões analisados (harmana, harmina, harmol, harmalina e harmalol), encontrados em *Passiflora*. Com a espécie *Passiflora alata* Dryander, Passifloraceae, oficializada pela Farmacopéia Brasileira 2ª e 3ª edições, foi realizado um estudo preliminar da formulação elixir para incorporar a tintura de maracujá, acompanhando-a, por oito meses, enfocando aspectos físicos, químicos e microbiológicos. O elixir não manteve suas características iniciais, sendo necessária a reformulação.

## ABSTRACT

---

The leaves of passion fruit are used for its sedative and anxiolytic properties as extract, tincture, infusion and by decoction. The aim of this work was to study the morpho-anatomical characteristics and to investigate the alkaloidal moiety of *Passiflora actinia* Hooker, Passifloraceae. The species is widely distributed in the Southern part of Brazil, although no work so far has been reported.

The leaf morpho-anatomical analysis has shown an oval shape, smooth margins, obtuse apex, rounded base and entire limb. Papillose abaxial epidermis, dorsiventral mesophyll, collateral bundles and idioblasts containing druses were observed.

HPLC analysis using authentic samples of the five main alkaloids (harman, harmine, harmol, harmaline and harmalol) have shown traces of harman in the alkaloidal fraction. With *Passiflora alata* Dryander, an official species described in the Farmacopéia Brasileira 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> edition, a preliminary study was performed with the aim of introducing the passion fruit tincture in an elixir formulation. The physical, chemical and microbiological aspects of the formulation were followed during eight month period. The results have shown no maintenance of the initial characteristics. Therefore, studies of improving the elixir formulae are required.

# INTRODUÇÃO

---

O emprego dos vegetais como alimento e como medicamento encontra-se registrado em documentos arqueológicos a partir dos anos 3.000 a. C. (SCHÜLER, 1987). Cada povo, cada grupamento humano traz conhecimentos sobre as plantas medicinais, herdados de seus ancestrais (ELDIN; DUNFORD, 2001). Sem dúvida, a origem dessas descobertas e desses conhecimentos vêm da observação dos fenômenos da natureza e na conseqüente experimentação empírica desses recursos (DI STASI, 1996).

A partir desses conhecimentos acumulados pela medicina popular foram desenvolvidos alguns medicamentos utilizados na medicina científica, como os glicosídeos digitálicos e os alcalóides. A pesquisa acadêmica trouxe novos conhecimentos sobre as plantas e suas propriedades terapêuticas, contribuindo decisivamente nos ramos da fisiologia, da farmacologia, da química orgânica e da bioquímica. O grande impacto causado pelas descobertas dos antibióticos, dos barbitúricos, dos anestésicos locais e dos analgésicos fez com que a utilização das plantas medicinais e de suas formas derivadas diminuíssem em relação à utilização dos medicamentos industrializados.

Tal postura começou a modificar nas últimas décadas do século XX, quando alguns fatores podem ter contribuído para o aumento da procura e da aquisição de plantas medicinais pela população, destacando-se os efeitos indesejáveis causados pelo uso abusivo dos medicamentos sintéticos; as expectativas exageradas criadas em torno dos produtos industriais; o reconhecimento de que para o desenvolvimento de novos medicamentos, seriam necessárias pesquisas de plantas medicinais e as dificuldades financeiras da população para obter os medicamentos.

Hoje, a utilização das plantas medicinais não se restringe somente aos menos favorecidos economicamente. Tornou-se uma forma alternativa ou complementar aos medicamentos industrializados, sendo de fácil obtenção em locais públicos, em farmácias e supermercados, mostrando uma tendência



generalizada dos consumidores em utilizar, preferencialmente, produtos de origem natural (SIMÕES et al., 1999).

Os mesmos autores relatam que, devido a tal fato, torna-se necessário fazer um controle rígido das plantas, desde a aquisição das mesmas até a elaboração do produto final. Essa preocupação resultou na normatização do registro de medicamentos de origem vegetal, junto aos órgãos de vigilância sanitária representativos do governo, que, elaboraram uma série de exigências relacionadas com a comprovação da eficácia, segurança e especificações de qualidade, envolvendo desde a matéria-prima, processamento tecnológico, até a elaboração do produto final. Objetivando o desenvolvimento tecnológico de formulações a partir de drogas vegetais com parâmetros de qualidade confiáveis, foi emitida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária a Resolução – RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000, visando a organização do mercado de fitoterápicos no Brasil. Traz definições importantes a respeito de matéria-prima vegetal, droga vegetal adjuvante, marcadores, medicamento fitoterápico tradicional e princípio ativo, dentre outras, diretrizes para a obtenção de registro dos medicamentos de origem vegetal e também com a realização de ensaios de toxicidade, pré-clínicos e clínicos para a obtenção de registro do medicamento fitoterápico no Brasil (ANVISA, 2000).

No serviço público municipal de saúde de Curitiba, foi implantada a fitoterapia com a proposta do incentivo ao uso terapêutico criterioso de plantas medicinais, dirigida especialmente à população menos favorecida. Esse projeto teve sua origem devido às dificuldades notadas no modelo biomédico atual, tais como, pouca valorização dos aspectos psíquicos do doente, o aumento de efeitos colaterais e o alto custo da medicação (GRAÇA, 1987). Foi implantado também, o Programa Farmácia Caseira, em 1989, o qual baseou-se na educação ambiental e conservação de plantas medicinais (REIS; MARIOT, 1999).

O resgate dessa cultura popular tem provocado um aumento do número de estudos, com conseqüente aumento desenfreado de medicamentos à base de plantas, muitas delas comercialmente conhecidas apenas pelos seus nomes populares, sem nenhum estudo que comprove seus efeitos ou avalie sua toxicidade. A retomada do hábito em utilizar as espécies vegetais para fins de tratamento, por meio de extrativismo, sugere que planos para a conservação das

espécies sejam desenvolvidos, bem como alternativas para a população para a utilização desses recursos naturais para fins econômicos, devem ser associadas à necessidade de preservação do equilíbrio dos ecossistemas tropicais (REIS, 1996). Faz-se necessário estudar as plantas medicinais com a mesma seriedade que requer o estudo de um medicamento sintético, a fim de se obterem trabalhos mais elaborados, com maior credibilidade científica e com menores probabilidades de erros, estabelecendo, por meio dos conhecimentos científicos registrados, a garantia da qualidade do medicamento fitoterápico (ELISABETSKY, 1999).

Dentre muitas drogas de origem vegetal, destaca-se o maracujá, o qual é tradicionalmente utilizado na medicina popular como sedativo e ansiolítico. A espécie de maracujá amplamente estudada em relação aos seus princípios ativos e ação farmacológica é *Passiflora incarnata* Linnaeu, Passifloraceae (PEREIRA E VILEGAS, 2000; MILLS e BONE, 2000) e consta em monografias das Farmacopéias Francesa, Européia, Austríaca, Suíça e Britânica (PASTENE; MONTES; VEJA, 1997). Porém, essa espécie não tem grande difusão no Brasil, o que segundo MORAES (1995) pode estar relacionado com o fato de seu fruto possuir sabor amargo e não se adaptar bem ao clima brasileiro. Isso gera um desinteresse por parte dos produtores e faz com que, para a sua utilização seja necessário importar folhas dessa espécie, além de que a espécie oficializada pela Farmacopéia Brasileira 2ª edição (FARM. BRAS. II, 1959) e Farmacopéia Brasileira 3ª edição (F. BRAS. III, 1977), é *Passiflora alata* Dryander. OGA et al. (1984) relatam a escassez de literatura relacionada com *Passiflora alata*, permanecendo ainda a dificuldade de aquisição de literatura científica sobre a espécie, o que desperta o interesse e a necessidade de estudar espécies brasileiras mais detalhadamente para, no futuro, estabelecer parâmetros mais sólidos em relação a atividade farmacológica, composição química, caracteres morfo-anatômicos das várias espécies aqui encontradas com facilidade e em abundância.

Por essas razões, dentre as inúmeras espécies existentes no país, destaca-se também a espécie de *Passiflora actinia* Hooker, Passifloraceae que se apresenta amplamente distribuída nos estados da região Sul do Brasil (CERVI, 1981). É uma espécie pouco estudada, sendo escolhida como objeto de estudo

para a elucidação de seus caracteres morfológicos, anatômicos e químicos, no sentido de contribuir com o estudo das espécies de maracujá no Brasil.

Por outro lado, considerando-se a grande procura pelo efeito sedativo do maracujá, o qual ocupa lugar de destaque entre os produtos fitoterápicos registrados no país (ORTEGA et al., 1989), pode-se encontrar no comércio algumas formulações fitoterápicas, à base de maracujá, tradicionalmente utilizadas pela população. Embora encontrem-se bastante difundidas no comércio, essas formulações, quando manipuladas como tinturas, possuem um sabor desagradável, devido ao amargor proveniente das folhas do vegetal, e à composição alcoólica. Em alguns casos, esses motivos fazem com que o tratamento seja descontinuado ou substituído, principalmente, quando destinados ao uso infantil ou a pessoas portadoras de alcoolismo.

Nesse sentido, surge também o interesse em iniciar estudos de formulações, que poderão gerar uma nova opção galênica para incorporar a droga maracujá, com a finalidade de atenuar as deficiências de sabor apresentadas pelas tinturas, mas mantendo as potencialidades terapêuticas do vegetal.

Apesar de *Passiflora incarnata* L. estar relacionada na Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2000), como a espécie indicada para o desenvolvimento de produtos fitoterápicos, pelos motivos já citados a espécie de escolha para a realização da proposta de formulação será *Passiflora alata* Dryander, pois, até o momento é a espécie oficializada pela Farmacopéia Brasileira (FARM. BRAS. II, 1959; F. BRAS. III, 1977) oferecendo respaldo para tal desenvolvimento.

## Considerações gerais

### - Posição sistemática das espécies

Segundo Engler (JOLY, 1998):

Divisão: Angiospermae (Anthophyta)

Classe: Dicotyledoneae

Subclasse: Archichlamydeae

Ordem: Violales

Família: Passifloraceae

Gênero: *Passiflora*

Espécies: *Passiflora actinia* Hooker

*Passiflora alata* Dryander

Segundo CRONQUIST (1988):

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Dilleniidae

Ordem: Violales

Família: Passifloraceae

Gênero: *Passiflora*

Espécies: *Passiflora actinia* Hooker

*Passiflora alata* Dryander

### **- Gênero *Passiflora***

A família Passifloraceae compreende cerca de 23 gêneros (BARROSO, 1978) e 600 espécies com distribuição, principalmente, nas Américas e na África (BARROSO, 1978; JOLY, 1985).

São plantas escandentes, herbáceas ou lenhosas e possuem gavinhas, as quais são ramos florais modificados (BARROSO, 1978) e ainda pode ser detectada a presença de nectários extraflorais, que são glândulas secretoras de néctar ou resinas (METCALFE, 1988).

As folhas são simples, alternas, inteiras ou lobadas e apresentam estípulas (BARROSO, 1978; JOLY, 1985). Foi observado por BARROSO (1978) a presença de tricomas simples, unicelulares, às vezes uncinados, e tricomas bicelulares, com uma célula terminal longa, com cutícula bastante espessada. Esses tricomas são detectados em todo o limbo foliar, mais freqüentemente ao longo das nervuras e sobre o pecíolo.

As flores são muito vistosas, grandes, andróginas ou unissexuadas, monóicas ou dióicas, geralmente circundadas por grandes brácteas involucrais (BARROSO, 1978). Nas Passifloraceae, o cálice possui cinco sépalas persistentes, livres ou unidas na base. Segundo esta autora, a corola apresenta cinco pétalas, mas pode apresentar de três a cinco, conforme descrito por JOLY (1985) e encontra-se livre ou parcialmente concrescida. O androceu é constituído de cinco estames, os quais se encontram dispostos sobre um andróforo e as anteras mostram-se biloculares. O gineceu é súpero, unilocular e formado de três a cinco carpelos dispostos sobre um longo ginóforo. Podem-se detectar numerosos óvulos; os estiletes apresentam-se livres ou concrescidos entre si (BARROSO, 1978).



Figura 1. *P. actinia*, evidenciando a flor.

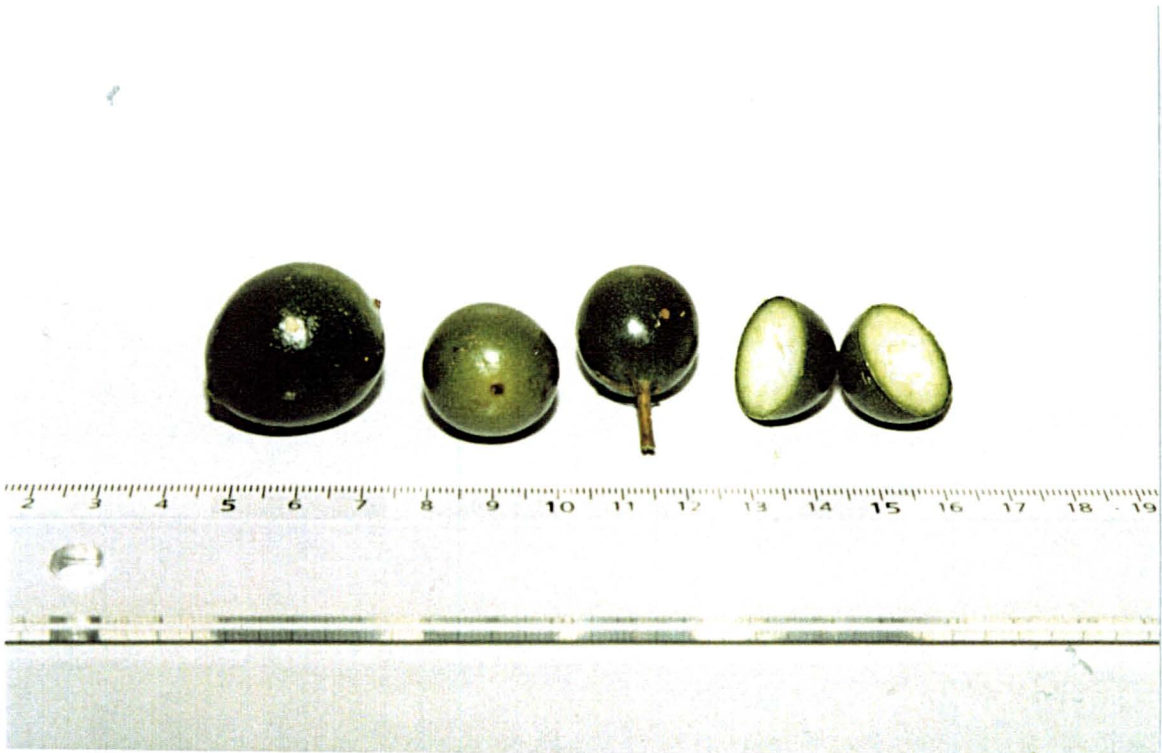


Figura 2. *P. actinia*, detalhe dos frutos.

Os frutos são do tipo baga, geralmente globosa e as sementes encontram-se comprimidas, com endosperma protéico e oleoso. O embrião presente é reto e bem desenvolvido (BARROSO, 1978).

O nome *Passiflora* provém do latim *passio*, o equivalente à paixão e *flos oris*, o equivalente à flor, resultando em “flor da paixão”. Esse nome foi dado pelos jesuítas devido às características físicas de suas flores, os quais as utilizavam para catequização como elementos simbólicos da “Paixão de Cristo” (FREITAS, 1985; ALONSO, 1998; KRUGER, 1992; GRIEVE, 1994).

É o gênero predominante da família, representado por aproximadamente 83 espécies (BARROSO, 1978), tendo sido descrita pela primeira vez por Nicolau Monardis em 1569 (SOUZA, 1997). No Brasil, são conhecidas por “maracujás” (SOUZA; ORTEGA, 1997), termo originário do tupi guarani *muruku’ia*, que significa comida feita em cuia, numa alusão aos frutos édulos do vegetal (MORAES, 1995).

O uso popular de *Passiflora* foi decorrente de suas propriedades sedativas, tendo iniciado no século XVII na Europa (FREITAS, 1985), encontrando-se relatos na literatura sobre suas propriedades antiespasmódicas, seu uso para insônia e para histeria (KRUGER, 1992; DELLA LOGGIA, 1993; GARCIA et al., 2000; PDR, 2000), também encontram-se descritas suas atividades hipnótica suave (SCAVONE e PANIZZA, 1978), hipotensora (GRIEVE, 1994) e miorrelaxante (GARCIA et al., 2000); ainda espécies de *Passiflora* são indicadas em casos de asma, diarreia e convulsão infantil (BALBACHAS, 1957) e, segundo DUKE (1997), podem ser utilizadas no tratamento de Mal de Parkinson. Há relatos da utilização das folhas do maracujá no combate a febres intermitentes, em inflamações cutâneas, em erisipela e também como anti-helmínticas. A polpa dos frutos de *Passiflora* é muito apreciada na fabricação de refrigerantes e sucos (CORRÊA, 1984).

Em relação aos estudos farmacológicos, os primeiros relatos só começaram a aparecer no final do século XIX, sobre *Passiflora incarnata* (FREITAS, 1985), que é nativa dos Estados Unidos, onde é conhecida por “passion flower” (BHP, 1983). Apesar dos inúmeros experimentos laboratoriais desenvolvidos com o intuito de precisar a atividade farmacológica de *Passiflora*, ainda não se pode afirmar à qual classe de compostos se deve tal atividade

sedativa, se a um composto isolado ou a grupos de compostos químicos (PEREIRA; VILEGAS, 2000; DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2001). Anteriormente, LUTOMSKI e WROCINSKI (1960) enfatizaram a importância da presença conjunta das frações alcalóidicas e flavonoídicas para a eficácia terapêutica.

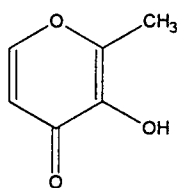
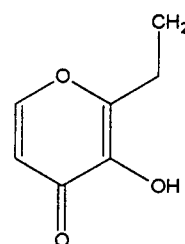
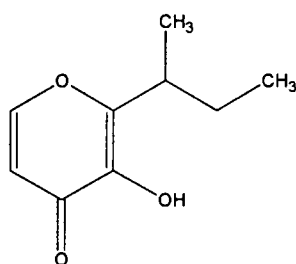
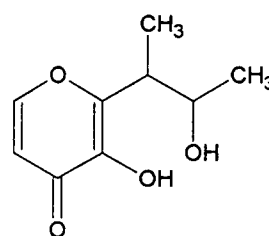
Primeiramente, RUGGY e SMITH (1940) detectaram a atividade hipotensora em *P. incarnata*, bem como uma atividade de contração dos músculos bucais. Esses mesmos resultados foram obtidos por SHI et al. (2000), que também acrescentaram a possibilidade do efeito vasorrelaxante estar envolvido no efeito hipotensor demonstrado pelo alcalóide harmana.

As espécies *P. incarnata*, *P. edulis*, *P. bryonioides* foram estudadas por NEUGEBAUER (1949), tendo sido relatada a presença de uma substância que apresenta a atividade sedativa em baixas doses, sendo comparada à "maracujina".

Um trabalho realizado por THEODOSSIOU (1965), considera ser responsável pelo efeito sedativo de *P. incarnata*, o alcalóide 3-metil-4-carbolina (harmana).

AYOAGI; KIMURA; MURATA (1974) atribuíram parte da atividade sedativa de *P. incarnata* a derivados da pirona, como o maltol (1) e o etilmaltol (2). Ambos promoveram redução da movimentação espontânea dos animais, potencialização do sono barbitúrico e ação anticonvulsivante, sendo que o etilmaltol mostrou menor efeito da movimentação espontânea e maior atividade anticonvulsivante em relação ao maltol. Também foi relatado que alterações estruturais dos derivados do maltol poderiam mudar suas propriedades farmacológicas. Essa observação foi estudada posteriormente por KIMURA et al. (1980), os quais constataram que os ácidos 2-butil (3) e 2-isobutilpiromecônico (4) apresentaram atividade anticonvulsivante e redução da movimentação espontânea mais potentes em relação ao primeiro experimento.



**1****2****3****4**

No mesmo ano, ROMMELSPACHER (1980) verificou a capacidade de ligação dos alcalóides  $\beta$ -carbolínicos a receptores benzodiazepínicos em ratos, sendo harmana e *nor*-harmana os mais potentes inibidores específicos dos receptores benzodiazepínicos.

Extratos secos de *P. alata*, com princípios alcaloídicos do tipo harmana e flavonoídicos foram testados intraperitonalmente em camundongos, sendo obtida uma redução da movimentação espontânea dos animais, prolongamento do tempo de hipnose (*sleeping-time*) e mostraram também um aumento no tempo de latência das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (OGA et al., 1984). Resultados semelhantes foram obtidos por SPERONI; MINGHETTI (1988), porém, utilizando extrato fluido de *P. incarnata*, particionado por solventes orgânicos, tendo como produtos uma fração lipofílica e outra hidrofílica, ambas ativas.

WOLFMAN et al. (1994) sugeriram que o flavonóide crisina (**5**), isolado de *P. coerulea*, seria um agonista parcial dos receptores benzodiazepínicos, já que demonstrou possuir ação ansiolítica sem indução de sedação ou de relaxamento muscular.

Um relato clínico de vasculite cutânea e urticária foi descrito por SMITH; CHALMERS; NUKI, (1992), o qual foi associado com a ingestão de preparação contendo *P. incarnata*.

GIAVINA-BIANCHI JUNIOR et al. (1997) descreveram um caso de reação alérgica ocasionado por *Rhamnus purshiana* e por *P. alata*, as quais desencadearam doença respiratória ocupacional.

Foi testada a atividade antiinflamatória do extrato etanólico, das partes aéreas de *P. incarnata*, em comparação com a atividade do ácido acetilsalicílico, porém, não foram obtidos subsídios para saber se há participação de mediadores endógenos, nem mesmo qual a natureza química dos compostos responsáveis por esse efeito (BORRELLI et al., 1996).

De acordo com SOULIMANI et al. (1997), a propriedade ansiolítica de *P. incarnata* foi confirmada por meio de testes em camundongos com extrato hidroalcoólico e, a partir de extrato aquoso foi detectado o efeito sedativo. As diferenças observadas caracterizaram uma atividade dependente do solvente que se utiliza no preparo do extrato.

Em outro experimento realizado, ZANOLI; AVALONE; BARALDI (2000) administraram apigenina e crisina, isoladas de *Matricaria chamomilla* e de *P. incarnata*, intraperitonealmente em camundongos e detectaram que ambos flavonóides promoveram redução da movimentação espontânea. Por outro lado, somente a crisina exibiu efeito ansiolítico em dose de 1mg/kg, não sendo possível atribuir esse efeito a uma interação do flavonóide com seus receptores benzodiazepínicos, pois estes encontravam-se bloqueados por injeção de flumazil.

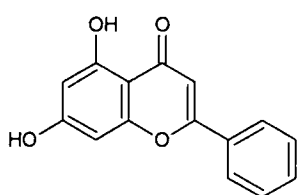
A toxicidade de *P. incarnata* foi estudada por FISHER; PURCELL; LE COUTEUR (2000), que relataram um caso de intoxicação devido à ingestão da droga, em doses terapêuticas. Os sintomas observados foram de náusea intensa, vômito, fraqueza, sonolência, bradicardia, arritmia ventricular seguidos de episódio de taquicardia.

PETRY et al. (2001) avaliaram a atividade ansiolítica de extratos hidroetanólicos de folhas de *P. alata* e de *P. edulis* através do teste de labirinto em cruz elevado (*elevated plus-maze*), que é um modelo rápido, simples e

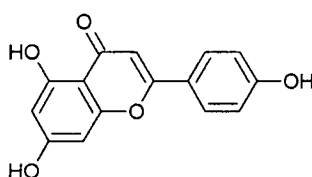
sensível para a detecção de efeitos ansiolíticos. Esses extratos demonstraram atividade em doses de 50, 100 e 150mg/kg.

Os flavonóides que fazem parte da constituição química das Passifloraceae, são caracterizados como pigmentos polifenólicos abundantes em plantas, os quais possuem atividade biológica e são de interesse quimiotaxonômico e, freqüentemente, são utilizados como “marcadores” na análise de medicamentos fitoterápicos (QIMIN et al., 1991; BOKSTALLER; SCHIMIDT, 1997). Os encontrados em *Passiflora* são do tipo C-glicosídeo, onde os açúcares estão ligados ao núcleo aromático por uma ligação carbono-carbono, resistente à hidrólise ácida (ZUANAZZI, 1999). Esses flavonóides são menos solúveis em acetato de etila do que as agliconas de flavonas, podendo permanecer na fase aquosa após hidrólise (MARKHAM, 1982).

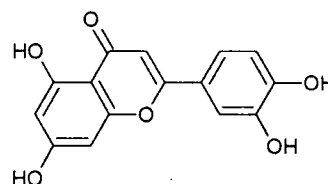
Os estudos em relação aos flavonóides de *Passiflora* relatam que são derivados da apigenina (6) e luteolina (7) (GEIGER; MARKHAM, 1986). Alguns flavonóides detectados nas espécies de *Passiflora* foram os seguintes: orientina (8), homoorientina (9), isovitexina (10), vitexina (11), schaftosídeo (12) e swertisina (13) (PEREIRA; VILEGAS, 2000).



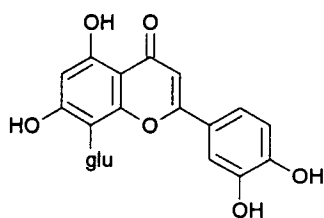
5



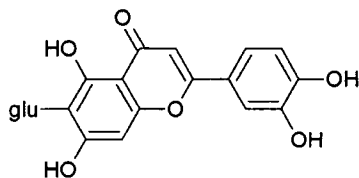
6



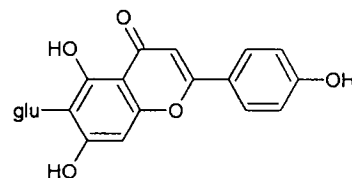
7



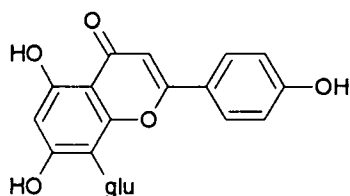
8



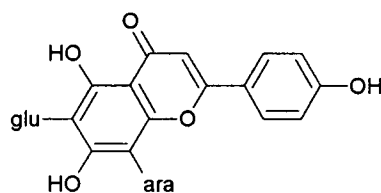
9



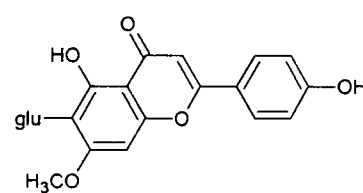
10



11



12



13

Os dados encontrados na literatura sobre a quantificação dos flavonóides são contraditórios, pois a fração flavonoídica está sujeita a variações no seu conteúdo que podem ser devido à época de colheita, ao local de cultivo ou à metodologia de análise empregada (QIMIN et al., 1991). No trabalho descrito por SCHILCHER (1968), pode-se constatar esse fato, visto que suas análises mostraram que as folhas e flores de *P. incarnata* são relativamente equivalentes quanto ao teor de flavonóides totais, enquanto que, no caule ocorrem em proporções aproximadamente quatro vezes menor.

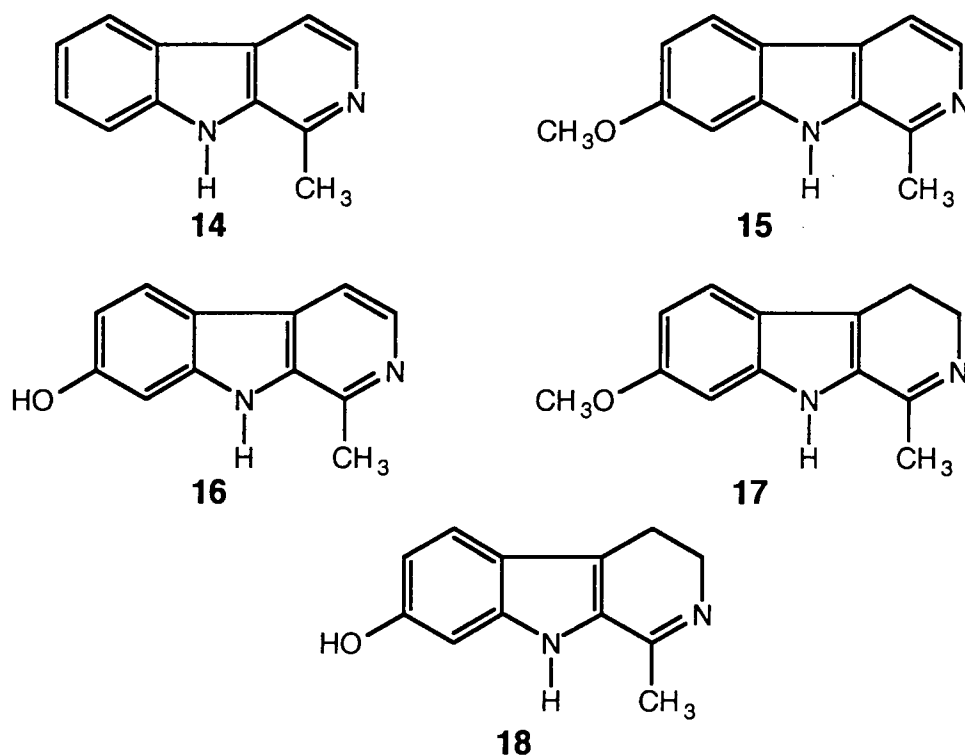
Um outro trabalho, analisando os diversos estágio de desenvolvimento de *P. incarnata*, verificou que o teor de flavonóides é maior nas folhas (3,05%). Ainda demonstrou que a mais alta concentração do flavonóide isovitexina ocorre no período que antecede a floração (3,60%) até o período de floração do vegetal (3,91%) (MENGHINI; MANCINI, 1988).

Outra classe que faz parte da constituição do gênero em estudo são os alcalóides do grupo indólico, sendo também de muita utilidade na medicina, como tranqüilizantes e no tratamento da hipertensão (HARBORNE; BAXTER, 1995).

FELLOWS e SMITH (1938), inicialmente, realizaram a tentativa de caracterização de compostos alcaloídicos, frente aos reativos de Mayer e de Wagner em *P. incarnata*, porém a análise do extrato clorofórmico em questão indicou ausência dos mesmos.

Anos mais tarde, foram detectados harmana (**14**), harmina (**15**), harmol (**16**), harmalina (**17**) e harmalol (**18**) em estudos realizados na década de 60 sobre *P. incarnata*, utilizando métodos de cromatografia em camada delgada (CCD) para tais análises (LUTOMSKI, 1959; LUTOMSKI, 1960; LUTOMSKI et al., 1967; LUTOMSKI; ADAMSKA; JARUZELSKI, 1968; BENNATI, 1971).

Posteriormente foi utilizado método seletivo, com alta resolução, o qual também possibilitou a obtenção dos alcalóides já referidos (REHWALD; STICHER; MEIER, 1995).



Estes mesmos autores relataram que certa discrepância foi observada em relação aos valores obtidos na literatura durante a quantificação dos alcalóides, visto que, somente traços de harmana (**14**) ou mesmo a não detecção desse alcalóide foram relatados em estudos recentes sobre *P. incarnata*. Alguns fatores podem ser atribuídos a essas variações obtidas em drogas vegetais, como: os órgãos empregados, a época e o local de coleta. LUTOMSKI; MALEK (1975) já haviam comparado o teor de alcalóides harmânicos nos diferentes órgãos vegetais de *Passiflora edulis* Sims. e verificaram que nas folhas ocorria uma maior concentração dessas substâncias. Outro estudo foi realizado nesse aspecto, com *P. edulis* f. *flavicarpa*, onde foi verificada a presença de alcalóides, expressos em harmana, em todas as partes, exceto nas raízes (LUTOMSKI; MALEK, 1976). Por fim, também foi possível a detecção de ácidos fenólicos, cumarinas, fitosteróis, glicosídeos cianogênicos e maltol (**1**) fazendo parte da constituição de espécies de *Passiflora* (ZUANAZZI, 1999).

## **- Desenvolvimento tecnológico**

Para assegurar a qualidade de um produto fitoterápico, faz-se necessário o estabelecimento de parâmetros de qualidade, os quais possam vir a controlar a sua produção, desde o cultivo até a elaboração do produto final. A matéria-prima vegetal é a chave para a obtenção do produto final com qualidade, contudo, não se pode atribuir unicamente à droga, e sim a um conjunto de ensaios que demonstrem a ausência de efeitos tóxicos, de contaminantes nocivos, de produtos de degradação (FARIAS, 1999).

Normalmente, os parâmetros de avaliação da qualidade da matéria-prima vegetal são caracterizados por critérios de identidade, de pureza e de teor, descritos nas farmacopéias.

A análise sensorial, isto é, o aspecto visual, o sabor, o odor e a percepção ao tato são ensaios que fornecem, de maneira rápida e simples, vestígios da identidade e pureza do material vegetal. Se, por meio dessas análises a amostra diferir evidentemente dos parâmetros pré-estabelecidos, considera-se que deva ser rejeitada. Sugere-se a utilização de padrões autênticos de comparação durante essas análises.

A identificação botânica e a caracterização de seus constituintes químicos ativos e/ou característicos demonstram a autenticidade de uma amostra. Por meio dos ensaios macroscópicos e microscópicos, de diferentes partes do vegetal que compõem a droga, em comparação com literaturas especializadas, pode-se diferenciar espécies de um mesmo gênero ou detectar outras que apareçam comumente como adulterantes.

Em se tratando de plantas íntegras ou grosseiramente rasuradas, deve-se avaliar conjuntamente suas características morfológicas, sendo ainda mais complexo avaliar amostras pulverizadas, as quais exigem o reconhecimento mais aprofundado das estruturas microscópicas diferenciais (FARIAS, 1999).

Quando se utiliza da caracterização de constituintes químicos para determinar a identidade da espécie, deve-se atentar para que essas substâncias possuam uma relação com sua atividade terapêutica ou sejam facilmente identificadas. Essas reações, na maioria dos casos, não devem ser utilizadas

como único método de caracterização. O autor citado anteriormente recomenda a determinação do perfil cromatográfico do constituinte avaliado, com a utilização de um padrão da substância característica, de extrato de amostra autêntica ou de substância marcadora. É bastante utilizada a cromatografia em camada delgada, quando a matéria-prima adquirida se encontra sob a forma de preparado fitoterápico intermediário como tinturas, extratos, entre outros.

Para verificar o estado de pureza da amostra vegetal pode-se utilizar alguns critérios, tais como a pesquisa de elementos estranhos, que consiste em separar os órgãos vegetais da planta, que sejam diferentes daqueles estabelecidos como a parte a ser utilizada e retirar outras impurezas como fungos, insetos, areia e pedras (LIST; SCHMIDT, 1989). Dentro desse critério, é freqüente analisar a presença de constituintes químicos, por meio de reações químicas de caracterização ou por métodos cromatográficos. A determinação do teor de cinzas permite a verificação das possíveis impurezas inorgânicas não voláteis, que estejam contaminando a amostra (FARIAS, 1999). OLIVEIRA e AKISUE (1998) relatam que, para cada droga são estabelecidos limites para a presença desses contaminantes, que podem variar de acordo com o órgão vegetal utilizado como droga

Na verificação da pureza, a determinação do teor de umidade é importante, levando em conta que um excesso de água presente na amostra poderia possibilitar o desenvolvimento de fungos e de bactérias, além de permitir a ação de enzimas na degradação de constituintes químicos (EVANS, 1996; FARIAS, 1999).

O teor de microorganismos viáveis também é alvo para a avaliação, quando se trata de controle de qualidade. Os limites para a carga microbiana viáveis totais e ausência de patógenos são descritos pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição (F. BRAS. IV, 1988) e também pela normas da Organização Mundial de Saúde – OMS (WHO, 1998), ambas preconizadas pela Resolução (ANVISA, 2000).

Em relação a outro determinante no controle farmacognóstico, a pesquisa de agrotóxicos ou de pesticidas também é recomendada pela OMS (WHO, 1998) e define a análise de organoclorados e de organofosforados, por deixarem ação residual. Os metais pesados como chumbo, cádmio, cobre e arsênio devem ser

determinados a partir de metodologias adequadas, pois a presença destes podem ser decorrente de resíduos de agrotóxicos ou de poluentes ambientais. Esses parâmetros de avaliação também são citados por LIST; SCHMIDT (1983) e FARIAS (1999).

Por fim, na avaliação farmacognóstica, o teor da substância ativa pode ser determinado por meio de métodos cromatográficos gerais e adequados para cada substância ou grupos (WAGNER; BLADT, 1996), juntamente com metodologias espectroscópicas em ultravioleta. Baseado em estudos científicos, esse teor de constituintes pode variar com a época e o local de coleta, formas de cultivo e clima, sendo definido então, um limite mínimo aceitável de princípio ativo. Contudo, esse doseamento nem sempre é possível, pois em determinados vegetais, ainda não se tem embasamento preciso sobre a constituição química e atividade farmacológica (FARIAS, 1999). Nesses casos, o mesmo autor complementa que, a análise pode ser realizada utilizando-se marcadores químicos, segundo a abundância, facilidade de detecção e principalmente, aqueles que apresentem maior labilidade tecnológica.

Com o propósito de captação dos constituintes com atividade farmacológica, as soluções extrativas são obtidas, geralmente, a partir de drogas vegetais estabilizadas, sendo realizado, após o controle da qualidade dos mesmos, a escolha do processo extrativo que irá carrear esses constituintes ativos (GENNARO, 1995).

Uma solução extrativa é resultante da interação entre um determinado solvente frente a uma droga vegetal, ocasionando a dissolução parcial dos constituintes. À porção não dissolvida, a maior parte, dá-se o nome de marco ou resíduo.

As drogas de origem vegetal constituem um grande acervo de substâncias com propriedades farmacológicas que representam a matéria-prima para a preparação de medicamentos. O sabor desagradável da droga *in natura* fez com que os povos antigos elaborassem processos a fim de atenuarem estes inconvenientes. Um processo muito utilizado para a obtenção de soluções extrativas era a maceração em água que, com o passar dos tempos foi aprimorando-se, surgindo a infusão, a decocção – que caracterizavam a



associação do calor à capacidade do dissolvente (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1992).

A seletividade para a extração pode ser por meio da escolha do solvente adequado, o qual de acordo com COSTA (2000), não deve ser tóxico para o ser humano, e ainda, além de compostos ativos, também existem as substâncias sem interesse farmacodinâmico, que podem ser extraídas. Com a variação no teor alcoólico do líquido extrator pode-se obter alterações consideráveis de seletividade. Faz-se necessária a avaliação da solubilidade desses componentes frente ao solvente de escolha, apesar de saber-se que não existe seletividade absoluta (HELOU, 1989; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1992; GENNARO, 1995).

Além de seletiva, a solução extrativa ideal deve ser econômica e conservadora, isto é, deve resultar um bom rendimento extrativo num curto prazo de tempo, num volume mínimo e, finalmente, que seja inerte para não alterar a estrutura química dos princípios ativos dissolvidos.

Fatores como a divisão da droga, a agitação, a temperatura, a interação entre os componentes da planta e o líquido extrator, a tensão superficial, a natureza do solvente, o pH e o tempo de extração são determinantes durante o processo extrativo (HELOU, 1989; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 1999; SONAGLIO et al., 1999).

As farmacopéias determinam o grau de divisão a que a droga deve ser submetida previamente ao processo extrativo, a fim de se obter um bom poder de penetração do líquido extrator (F. BRAS. IV, 1988). Esse fator de divisão é dependente, em geral, da consistência do material vegetal a extrair, o qual, quanto mais rígido for, menor será o grau de divisão estipulado (COSTA, 2000). Geralmente, utiliza-se drogas inteiras na maceração de drogas resinosas, como em alcoolatura de epicarpo de limão (HELOU, 1989).

Esses processos clássicos de dissolução extrativa são lentos, sobretudo quando realizados à temperatura ambiente. Levando-se em conta que a renovação do solvente que entra em contato com a substância a dissolver tem papel fundamental na velocidade de dissolução, vale ressaltar que a agitação acelera o processo extrativo (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1992).

A temperatura também influencia na velocidade extrativa, pois o seu acréscimo ocasiona um aumento da solubilidade dos princípios ativos das

drogas, por outro lado, pode promover alterações como hidrólises, racemizações e descarboxilações (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1992; GENNARO, 1995). HELOU (1989) cita que, dependendo do processo extrativo que uma mesma droga é submetida, pode-se obter efeitos diferentes, como no caso da ipeca, que, quando na forma de infuso propicia a ação emética, e na forma de decocto é antidisentérica.

Devido à riqueza e complexidade de constituintes de uma droga vegetal, estuda-se a existência de fenômenos de interação mútua entre as substâncias e o solvente, determinando situações capazes de aumentar a solubilidade de um constituinte ou de provocar a insolubilização de outros (LIST; SCHMIDT, 1989; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1992).

A tensão superficial interfere no processo de extração pois, maior é o poder de penetração do líquido extrator na estrutura do vegetal, quanto menor for a tensão superficial desse líquido (HELOU, 1989; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1992).

É importante a utilização de solventes inócuos nesses processos, sobretudo em soluções extrativas que sejam utilizadas com finalidade interna, preferindo-se nesses casos as soluções aquosas, as hidroalcoólicas, as de glicerina diluída com álcool ou com água, sempre considerando o fator seletividade já comentado (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1992), sem deixar de relatar que os solventes eleitos devem encontrar-se num grau de pureza adequada (COSTA, 2000).

Finalmente, o tempo de extração é dependente da divisão da droga, da estrutura e da natureza do princípio ativo a extrair. O que vai determiná-lo é a necessidade de uma extração completa ou relativa a uma substância, sendo geralmente prescritos pelas farmacopéias (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1992).

Quando o processo de escolha para a extração for o contato da droga com o solvente, por tempo e temperatura variáveis, denomina-se de maceração, o qual, de acordo com SONAGLIO et al. (1999), não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal, devido à saturação do líquido extrator. Ao passo que, o método dinâmico que se utiliza primeiramente da maceração, seguido de adições constantes de frações de líquido extrator, dá-se o nome de percolação,

deslocação ou lixiviação (GENNARO, 1995; SONAGLIO et al., 1999; COSTA, 2000).

Neste último processo ocorre uma renovação constante do solvente, o que possibilita esgotar os princípios ativos da droga com maior facilidade, quando comparado ao processo estático da maceração (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1992). Para proceder à percolação é necessário o uso de um aparelho com características definidas por seu formato em tronco de cone invertido, podendo ser de vidro, porcelana, cobre estanhado, aço inoxidável, possuindo um afunilamento na base inferior, com prolongamentos em forma de tubo acoplado a uma torneira, responsável pela regulação do escoamento do líquido (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1992; ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2000).

Modificações destas modalidades extrativas foram realizadas, com características definidas e próprias, derivando em outros métodos extrativos. Da maceração surgiu a digestão, a infusão e a decocção, à medida que, a evacuação, a diacolação e a extração em aparelho de soxhlet foram resultantes da percolação (HELOU, 1989).

No processo extrativo – digestão, é empregada uma temperatura mais elevada para incrementar a capacidade extrativa do método original, em torno de 40°C – 60°C (SONAGLIO et al., 1999). A infusão é a adição de água fervente sobre a droga por um certo tempo, geralmente mais reduzido se comparado ao da maceração ou digestão. Já a decocção, preconiza o contato da droga com o solvente, aquecido à ebulição por um determinado período de tempo, gerando o decocto ou o cozimento. O número de drogas passíveis a essa metodologia é muito reduzido, visto que a temperatura é muito elevada e o tempo de cozimento é prolongado (LIST; SCHMIDT, 1989; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1992).

A variante da percolação, a diacolação, é o processo de extração onde se acondiciona a droga em um ou em uma série de tubos estreitos e compridos, a fim de forçar o líquido extrator, sob pressão, a atravessar o material a extrair. Quando o líquido é deslocado através da droga por um vácuo gerado no frasco que destina-se a receber o extrato, denomina-se de evacuação. Na extração de sólidos com solventes voláteis, o aparelho de soxhlet é muito empregado, sendo possível a utilização de um volume relativamente reduzido de líquido extrator, porém mantendo a eficiência extrativa (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1992),

pois, é um tipo de percolação cíclica, com destilação simultânea e reaproveitamento do solvente (SONAGLIO et al., 1999).

As tinturas são consideradas soluções extrativas alcoólicas obtidas, principalmente, de drogas vegetais exsicadas. Foram introduzidas como forma galênica por *Teofrasto Paracelso* e inscritas primeiramente no *Dispensatorium valerii Cordi*. O nome é devido a alguns pigmentos apresentados pela forma galênica e ao fato de possuírem cor (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990).

Os mesmos autores sugerem que, o solvente a ser utilizado como extrator possua graduação alcoólica entre 30° e 90° GL, preferindo-se os de baixa graduação para drogas ricas em substâncias hidrossolúveis, e o álcool mais concentrado para as substâncias com menor hidrossolubilidade.

Os processos extrativos clássicos para a obtenção das tinturas são semelhantes aos descritos anteriormente para as soluções extrativas, a saber, maceração, percolação, dissolução do extrato seco correspondente, digestão e extração pelo aparelho de soxhlet (COSTA, 2000). As modificações necessárias desses métodos levaram aos vibromisturadores, aos moinhos coloidais, aos ultrasons, à utilização de agentes tensoativos, todas elas, levando em consideração a necessidade de aumentar a praticidade e a eficácia dos métodos originais para obtenção das tinturas (LIST; SCHMIDT, 1989; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990).

Existem meios para a identificação de tinturas que se fazem a partir de seus caracteres organolépticos (cor, odor, sabor), densidade, título etanólico, índices (acidez, permanganato, formol, água, iodo) e resíduo após evaporação, que juntos servem como um banco de dados para a confirmação da identidade da tintura em questão (LIST; SCHMIDT, 1989; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990; COSTA, 2000).

A porcentagem de cinzas de uma tintura é normalmente pequena e está relacionada com o grau alcoólico do dissolvente. Para o auxílio na identificação de tinturas, existem ensaios de capilaridade e de cromatografia em camada delgada, onde o primeiro método, dito capilarograma, é bastante rústico e baseado no fenômeno de capilaridade com posterior identificação de algumas substâncias através de reagentes como o hidróxido de potássio, alumínio. A cromatografia, em comparação ao método anterior, é a que melhor possibilita a

identificação de componentes, com revelação por meio de reações com álcalis (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990).

A determinação do grau alcoólico da tintura, que significa a porcentagem de álcool, em volume, existentes em 100ml de tintura e realizado por meio de metodologias inscritas em farmacopéias, F. BRAS. IV (1988), também fazem parte dos ensaios de identificação das tinturas.

Apesar de apresentarem estabilidade frente à invasão de microorganismos, as tinturas devem ser conservadas em frascos de vidro, preferencialmente âmbar, com rolha esmerilhada e ao abrigo da luz. Apesar dos cuidados, alterações podem vir a ser constatadas, como precipitações, que são comuns acontecerem, como por tanatos de alcalóides, silicatos e pelo frio (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990). Os mesmos autores citam que é comum a ocorrência de alguma incompatibilidade durante associações de uma tintura, demonstradas por formação de precipitados ou por turvações. Às vezes, pode-se atenuar esses inconvenientes, quer por meio da diminuição do pH do meio com ácido cítrico, tartárico, quer pela adição de glicerina ou propilenoglicol, para aumentar a viscosidade do meio, ou ainda adicionando tensoativos (O/A), para melhorar a solubilização de princípios insolúveis (GENNARO, 1995; ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2000).

Inúmeras as aplicações terapêuticas exibidas pelas tinturas, sendo dependentes dos princípios ativos das drogas utilizadas para o preparo. Existem as tinturas para uso externo que são as anti-sépticas, queratoplásticas, anestésicas locais, emolientes e as empregadas para uso interno, como as béquicas, expectorantes, sedativas, analgésicas, diuréticas, entre outras (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990)

De forma geral, as formas farmacêuticas líquidas de uso oral têm sido muito utilizadas devido à facilidade de administração, principalmente para pessoas que tenham dificuldade em deglutir as formas sólidas (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Entre as formulações líquidas para uso oral, tem-se os elixires que são soluções hidroalcoólicas límpidas e edulcoradas e são ótimos corretores de sabor devido a corantes e aromas que possam possuir, geralmente sabores frutais cítricos utilizados para seu desenvolvimento (GENNARO, 1995; JATO, 2000).

São vantagens apresentadas em relação às tinturas, as quais possuem sabor desagradável.

Tem origem árabe (*alacsir* ou *el-eksir*), que significa “quintessência” ou “pedra filosofal”, provavelmente, este termo foi inicialmente empregado para determinar um “pó mágico” que transformava metais em ouro. Logo após, serviu para nomear várias preparações de alquimia (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990).

Houve muita dificuldade em padronizar a terminologia farmacêutica atual, visto que, no passado o medicamento à base de tintura foi denominado de elixir, o “elixir paregórico”, e também o verdadeiro elixir de açafrão foi denominado de poção alcoólica (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990).

Na preparação do alcoóleo açucarado (elixir) deve-se dissolver o princípio ativo no álcool, incorporando a água, quer na forma de xarope, ou na forma de solução de sacarose ou com açúcar invertido (glucose e frutose). Para evitar precipitações é comum dispor de glicerina para aumentar a viscosidade do meio e aproveitar o seu poder edulcorante (GENNARO, 1995).

Contudo, se os testes de estabilidade forem incluídos, é interessante que sejam efetuados com base em ensaios com a capacidade de avaliar, em condições determinadas, alterações químicas e físicas, sendo que, estas últimas poderão ser detectadas, muitas vezes, por alterações na aparência, na cor, no odor e no sabor da formulação.

De acordo com LAPA et al. (1999), a estabilidade da forma farmacêutica de um produto fitoterápico pressupõe a uniformidade da matéria-prima em estudo, e conforme relatado por ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR (2000) pode demonstrar algum problema que poderá ocorrer na formulação, porém, não exclui a possibilidade de alguma ocorrência futura. Os dados obtidos no teste de estabilidade podem levar a uma reformulação do produto, quando este não for estável.

Os últimos autores descrevem que o produto elaborado deve ser avaliado em sua estabilidade pela extensão de tempo – prazo de validade, em que mantém as características originais do momento da elaboração.

De acordo com SCHUELLER; ROMANOWSKI; CULVER (1993) e NUDELMAN (1971) o teste de estabilidade avalia em condições específicas e

controladas, para acelerar o envelhecimento, a capacidade de um produto manter seu aspecto original, as características físicas e químicas. O dado de estabilidade é útil como um sistema antecipado de aviso que pode alertar sobre os problemas que poderão ocorrer nas formulações. Esse tipo de informação avançada pode ser útil de várias formas: para guiar o formulador durante o desenvolvimento do produto; para garantir que o produto continuará a ser esteticamente aceitável ao consumidor; para determinar que o produto terá o desempenho desejado e permanecerá seguro ao uso; para prevenir o fabricante sobre problemas que poderão ocorrer no produto, após a compra pelo consumidor. Apesar de fornecer informações antecipadas, o teste de estabilidade não é uma ciência exata, não garantirá um produto livre de problemas. Entretanto, poderá dar uma idéia dos riscos envolvidos e fornecer uma base científica sólida, para avaliação de problemas futuros.

Segundo a Farmacopéia Americana 24<sup>a</sup> edição (USP, 2000), a estabilidade é classificada em química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica. Na estabilidade química cada substância ativa mantém sua atividade e integridade conforme indicada na embalagem. Quando a aparência, uniformidade, dissolução e palatabilidade não são afetadas, faz-se referência à estabilidade física. A estabilidade microbiológica requer que haja resistência ao crescimento microbiano, da mesma forma que o efeito terapêutico de uma preparação não deve se alterar durante sua estabilidade. Por último, tem-se a estabilidade toxicológica, a qual não visa aumentos significativos de toxicidade (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2000).

Os mesmos autores citam também as metodologias para a avaliação da estabilidade, sendo importante determinar os efeitos de temperatura, luz, ar, pH, excipientes e solventes sobre a substância ativa, em preparações embaladas, estocadas adequadamente conforme metodologia, e que, em intervalos de tempos pré-determinados as amostras sejam analisadas. Também relatam ser indispensável a avaliação dos padrões adequados de embalagem para a manutenção da estabilidade e eficácia do produto, sendo necessário frisar que se houver qualquer alteração de embalagem, a formulação deve ser submetida a novos testes de estabilidade.

Existem alguns tipos de recipientes que levam em conta a capacidade de proteção do conteúdo em condições externas. Recipiente fechado é a denominação para a embalagem com condições mínimas de aceitação, onde o conteúdo é protegido de sólidos estranhos e contra perda de medicamento durante a manipulação, transporte, armazenagem ou distribuição.

O recipiente que protege o conteúdo de contaminação de líquidos, sólidos, vapores estranhos e contra evaporação é denominado de recipiente bem fechado. Aquele que é impermeável ao ar ou a qualquer outro gás, normalmente é estéril e utilizado para acondicionar preparações farmacêuticas de uso parenteral, é dito recipiente hermético (F. BRAS. IV, 1988; ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2000).

Segundo SATO (1998), as embalagens de vidro têm ótima resistência química e são impermeáveis. O vidro que se destina ao acondicionamento de produtos para uso oral e não parenteral são pertencentes à categoria NP, isto é, vidro sódico-cálcico para uso geral (F. BRAS. IV, 1988; ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2000).



## Objetivos

- Estudo morfo-anatômico das folhas de *Passiflora actinia* Hooker;
- Investigação de compostos alcaloídicos utilizando a espécie *Passiflora actinia* Hooker;
- Estudo preliminar e proposta de desenvolvimento do elixir de maracujá, com acompanhamento da formulação abordando aspectos físicos, químicos e microbiológicos, utilizando a espécie oficial – *Passiflora alata* Dryander.

## MATERIAL E MÉTODOS

---

### Material botânico

A coleta do material botânico foi realizada na Fazenda do Canguiri da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em três etapas, a primeira realizada no mês de dezembro de 2000, e as seguintes nos meses de março e de outubro de 2001, totalizando uma tomada de amostra de 36kg das partes aéreas frescas de *Passiflora actinia* Hook., Passifloraceae.

Foram confeccionadas exsicatas com o material adquirido, estando depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da UFPR sob o registro UPCB nº 30.831.

O material coletado foi devidamente processado para a realização do estudo morfo-anatômico e para a análise dos constituintes químicos.

Para a elaboração do estudo de formulação foram utilizadas folhas secas e moídas de *Passiflora alata* Dryander, Passifloraceae, as quais foram adquiridas através da Empresa Life – Laboratório Industrial da Farmácia Escola da Universidade Federal do Paraná. A granulometria estava adequada ao processo extrativo, segundo F. BRAS. IV (1988) – pó semifino. Foram também fornecidas pela mesma empresa, amostras rasuradas para a caracterização microscópica da droga.

## **Estudo morfo-anatômico**

Para o estudo morfo-anatômico, segundo JOHANSEN (1940), o material botânico foi fixado em solução de formaldeído, ácido acético e etanol a 70% (FAA 70) por sete dias e posteriormente estocado em solução etanólica a 70% (BERLYN; MIKSCHE, 1976). Foram preparadas lâminas semipermanentes a partir de secções transversais e paradérmicas, à mão livre, do limbo e da nervura foliar no terço inferior e do pecíolo, com o auxílio de suporte de isopor.

A coloração foi realizada com fucsina básica e azul de astra (ROESER, 1962) ou azul de toluidina (HADDAD, 1989). As lâminas semipermanentes foram montadas com glicerina diluída a 50% (BERLYN; MIKSCHE, 1976), utilizando-se para a lutagem esmalte incolor. Os reativos empregados para os testes histoquímicos foram: solução de floroglucina clorídrica para a verificação de lignina (FOSTER, 1949), Sudam III para lipídeos, cutina e suberina (SASS, 1951), glicerina iodada para amido e cloreto férrico para evidenciar os taninos (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

O registro dos resultados observados foi feito através de fotomicrografias em microscópio fotônico Olympus BX 40, acoplado à unidade de controle PM-20. Uma escala micrométrica foi fotografada e ampliada nas mesmas condições das fotos.

Foi realizada a análise ultra-estrutural de superfície (microscopia eletrônica de varredura) em lâmina foliar, nervura mediana e pecíolo, de acordo com SOUZA (1989). Fez-se necessária a desidratação das amostras fixadas em FAA 70 em série etanólica crescente, para então serem submetidas ao ponto crítico no equipamento Balzers CPD-010 e, após montagem em suporte adequado, serem metalizadas com ouro em aparelho Balzers Sputtering SDC-030. As eletromicrografias foram feitas em microscópio eletrônico de varredura Phillips SEM 505.

## **Estudo dos alcalóides terciários de *P. actinia***

Folhas secas à 45°C, em estufa e moídas (100g) de *P. actinia* foram extraídas em metanol (200ml), usando aparelho de soxhlet durante 10 horas. Obteve-se um extrato líquido de cor verde intensa, que foi evaporado e concentrado em rotaevaporador. Esse mesmo procedimento foi aplicado sucessivamente aos 7,5kg de droga.

Após finalizado o processo extrativo em soxhlet, o extrato resultante foi reunido em balão de fundo redondo e evaporado até forma pastosa e submetido à técnica clássica ácido-base para extração de alcalóides, segundo EVANS (1996), usando clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) como solvente orgânico e extraindo-se até que a fase orgânica não mais apresentasse reação positiva para alcalóides frente aos reativos gerais de precipitação de alcalóides (Mayer, Dragendorff e Bertrand). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e evaporada até secura, fornecendo 13,51g de extrato alcaloídico. A fração aquosa também apresentou reação positiva para alcalóides, mas foi separada para estudos posteriores. O extrato orgânico foi incorporado a uma coluna empacotada com sílica-gel G60 Merck 70-400 Mesh, sendo recolhidas 46 frações usando solventes com polaridade crescentes: *n*-hexano, *n*-hexano/clorofórmio (1:1), clorofórmio, e por fim, adições crescentes de metanol até proporção de clorofórmio/metanol (1:9). As frações foram avaliadas por cromatografia em camada delgada – CCD (tolueno-diclorometano-metanol-ácido fórmico - 4,5: 4,5: 1: 0,05), sendo que, as frações com mesmo perfil cromatográfico e reação positiva, frente aos reativos gerais de alcalóides, foram reunidas (26-32). Estas frações foram concentradas em rotavapor, sendo o resíduo do balão (6,53g) submetido a purificação com sistema ácido-base, de acordo com a metodologia já citada, fornecendo 1,77g de extrato alcaloídico bruto. Esse extrato foi submetido a uma nova coluna empacotada com sílica-gel, tendo sido recolhidas 106 frações com mistura de solventes de polaridade crescentes de diclorometano, diclorometano/clorofórmio (1:1), clorofórmio, clorofórmio/metanol (20:1) e aumentando a polaridade com uma mistura de clorofórmio/metanol até a concentração máxima de 10% de

metanol. As frações que apresentaram reação positiva frente aos reativos gerais de alcalóides (4-15; 35-42; 48-79; 89-97) tiveram o solvente evaporado, sendo submetidas, na seqüência, a um tratamento com ácido clorídrico a 5% (HCl) para desencadear a formação do sal dos possíveis alcalóides. Por meio desse tratamento, uma comparação por CLAE, com os padrões harmônicos comerciais (Fluka) foi possível, visto que esses se encontravam na forma de cloridrato.

As frações especificadas anteriormente, juntamente com os padrões harmônicos, foram submetidos a análise por CLAE. Os cromatogramas foram obtidos em aparelho SHIMADZU, bomba LC - 10AD, detector arranjo fotodiodo SPD-MIOA, forno CTO-10A com coluna LUNA RPC18 – PHENOMENEX (25cm x 0,46cm).

A metodologia utilizada para análise dos alcalóides de *Passiflora actinia* foi baseada em trabalho realizado por REHWALD e STICHER (1995), estabelecendo como condição analítica a fase móvel composta pela solução A (tampão fosfato – pH 8,0), filtrada em membrana de celulose regeneradas 0,4µm e por solução B (acetonitrila/metanol 1:1), com grau CLAE. O gradiente de eluição utilizado foi de 0 a 5 minutos 44% de B em A; de 5 a 18 minutos 60% de B em A, fluxo de 0,8ml/, temperatura de 30°C e o volume de injeção de amostra de 20µl. A absorbância foi monitorada nos comprimentos de onda de 240nm, 250nm e 370nm. As amostras foram diluídas em metanol, resultando em concentração final, relativa à cada fração, de aproximadamente 1mg/ml.

Em paralelo foram realizadas análises em ultravioleta (UV) dos padrões harmônicos por meio de aparelho SHIMADZU, UV-1601 PC software UVPC 3.91, cubeta de quartzo, 1cm de caminho ótico.

Os experimentos desenvolvidos para investigar a formação dos alcalóides derivados da harmana, pelo aquecimento, foram realizados com base na condensação de Pictet-Splenger, a partir da triptamina, de acordo com BROWN; JIANLI; SANTOS (2000).

#### Reação 1:

Adicionou-se triptamina (160mg), juntamente com acetaldeído (1ml), seguido de metanol (10ml), previamente seco, e de ácido clorídrico 1% (pH 4).

#### Reação 2:

A segunda reação foi constituída por 10g da droga, metanol (50ml), acetaldeído (1ml) e triptamina (160mg).

#### Reação 3 e 4

As reações 3 e 4 foram compostas por 10g de droga, metanol (50ml), acetaldeído (1ml) e ácido clorídrico (pH 4).

As três primeiras reações foram submetidas a refluxo durante 72h, sendo a quarta reação mantida em repouso pelo mesmo período de tempo, em temperatura ambiente. Na sequência, as amostras foram filtradas por papel de filtro, concentradas por rotaevaporador, sendo os respectivos extratos submetidos à técnica ácido/base e tratados com ácido clorídrico 5%, para posterior análise por CLAE, de acordo com as condições já citadas.

### **Desenvolvimento da formulação**

O material botânico na forma rasurada, foi inicialmente submetido à avaliação microscópica, através de microscópio fotônico, onde montou-se lâminas a partir de cortes transversais e paradérmicos do vegetal, com posterior clarificação das estruturas através de cloral hidratado, por meio do aquecimento. Os caracteres da droga foram avaliados de acordo com a descrição realizada pela F. BRAS. III (1977); FREITAS (1985) e por OLIVEIRA e AKISUE (1998).

Para os demais ensaios foi utilizado o material botânico pulverizado, sendo todas as análises efetuadas em triplicata.

O teor de cinzas totais e insolúveis em ácido e a perda de água por dessecação foram determinadas de acordo com a metodologia descrita pela F. BRAS. IV (1988).

Foi realizado o doseamento de flavonóides totais, expressos em hiperosídeos, segundo método descrito pela PHARMACOPOEA (1995) para *Passiflora incarnata*.

Após o controle inicial da droga, a mesma foi submetida ao processo extrativo para a elaboração do produto fitoterápico intermediário – a tintura de maracujá. A técnica adotada consta na FARM. BRAS. II (1959), na monografia de

tinturas. O líquido extrator foi utilizado de acordo com as especificações citadas pela literatura BHP (1983) NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, (1996) e , para *Passiflora incarnata*, álcool 45° GL na proporção 1:8 (droga/líquido extrator), de tal maneira que, para 100g de droga obteve-se no final 800ml de percolato. A tintura assim obtida foi filtrada e conservada em frasco âmbar hermeticamente fechado e em temperatura ambiente.

Para a avaliação da qualidade da tintura produzida foram utilizados parâmetros organolépticos como cor, sabor, odor e aspecto, além de determinação do título etanólico, do resíduo seco e densidade (F. BRAS. IV, 1988).

A mesma tintura foi submetida a avaliação de seu perfil cromatográfico, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando para análise um sistema de detecção, composto por uma coluna tipo RP 18 250-4, com fase móvel composta por solvente A (ácido fosfórico a 0,3%), solvente B (metanol) e solvente C (tampão fosfato, pH 7,5-8,0). Após o término desse procedimento, realizou-se a incorporação do produto fitoterápico intermediário à forma farmacêutica final.

O elixir foi preparado de maneira que o metilparabeno (0,2% m/v) foi pesado e adicionado ao propilenoglicol (1% v/v), em banho-maria (70°-80°C), até dissolução. Após resfriamento, foi acrescentada a tintura de maracujá (40% v/v) e a essência de limão (0,2% v/v) à mistura. A quantidade necessária de xarope de açúcar invertido foi adicionada, a fim de obter-se um volume final de 100ml. Em seguida, após homogeneização completa, o elixir foi envasado em frasco âmbar de vidro com tampa de rosca de polietileno.

A estabilidade da formulação final foi avaliada em relação a seus aspectos físicos, químicos e microbiológicos. Para a verificação da estabilidade física foi previsto, inicialmente, a avaliação no tempo zero, isto é, seguido à elaboração e, mensalmente, durante oito meses, sob temperaturas de 50°C, 40°C e à temperatura ambiente (15-30°C – F. BRAS. IV, 1988). Os parâmetros organolépticos (cor, odor, sabor e aspecto) fizeram parte dessa análise, além de determinações de viscosidade em Aparelho de Brookfield (modelo RV DVII+), com temperaturas de leitura entre 20-25°C, além de determinações de pH em potenciômetro.

A estabilidade microbiológica foi determinada segundo metodologia descrita pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998), avaliação das preparações vegetais de uso interno, sendo os ensaios conduzidos no tempo zero e após oito meses de estocagem, em temperatura ambiente. Os microorganismos avaliados foram aeróbios totais, bolores e leveduras, Enterobactérias em geral, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus*.

Previamente à realização do ensaio referido, foi necessário efetuar a inativação do conservante da amostra inicial. Com solução neutralizante composta por polissorbato 80 (10%), lecitina (0,5%), tiosulfato de sódio (0,7%) e sulfito de sódio (1%).



## RESULTADOS

---

### Estudo morfo-anatômico

As folhas adultas de *Passiflora actinia* Hook., Passifloraceae mostram uma superfície subcoriácea, completamente glabra, de coloração verde na face superior e levemente mais clara na face inferior. São folhas simples, e alternas com tamanho aproximado de 10cm. O contorno mais freqüente da folha é oval, sendo a margem lisa, o ápice obtuso, a base arredondada e o limbo inteiro. A nervura central e as secundárias apresentam-se mais salientes na face abaxial (Fig. 3 a 5). O pecíolo, medindo de 1,0 a 5,0cm, sustenta dois ou três pares de nectários extraflorais, nas regiões proximal, mediana e distal (Fig. 5 a 8).



**Figura 3.** *Passiflora actinia* Hook., Passifloraceae. Aspecto geral, evidenciando o hábito escandente.





Figura 4. *P. actinia*, detalhe do ramo foliar florido.

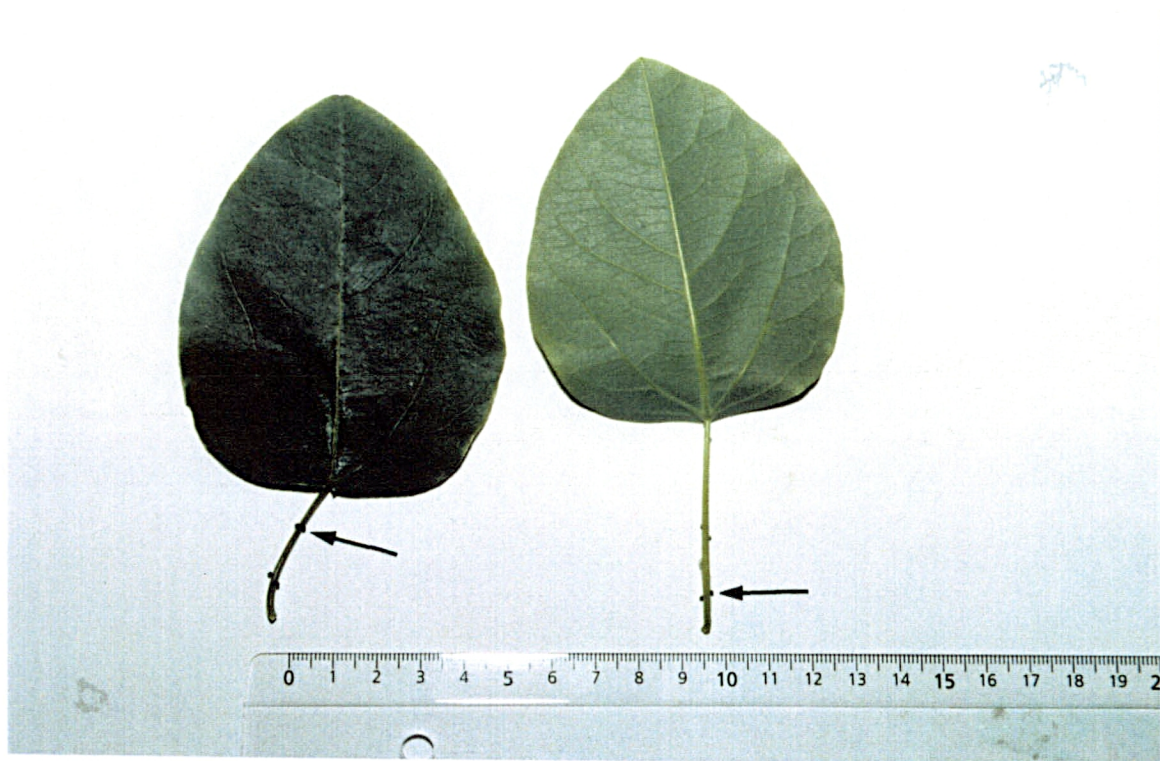
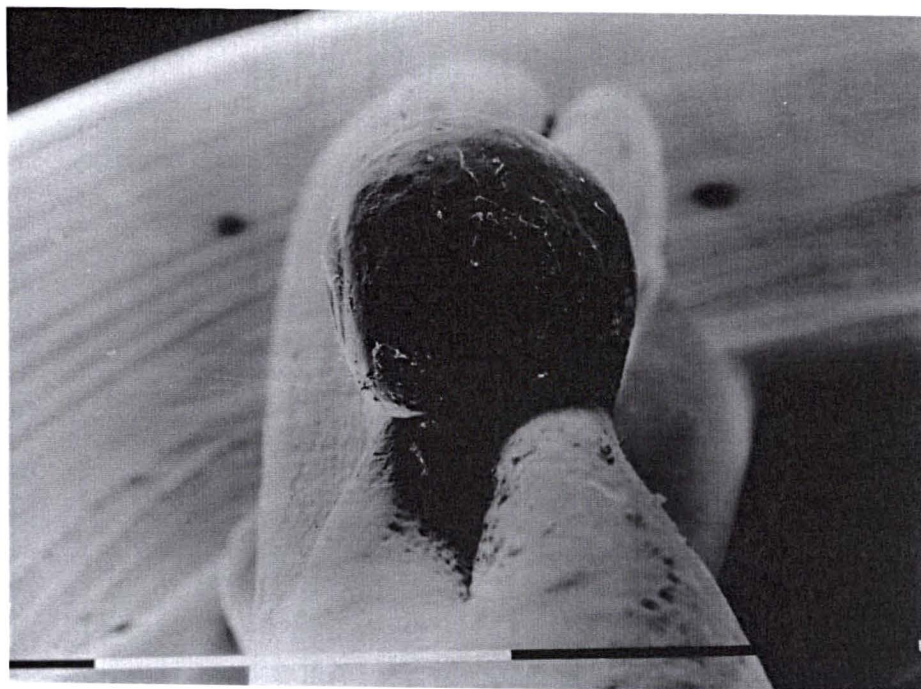
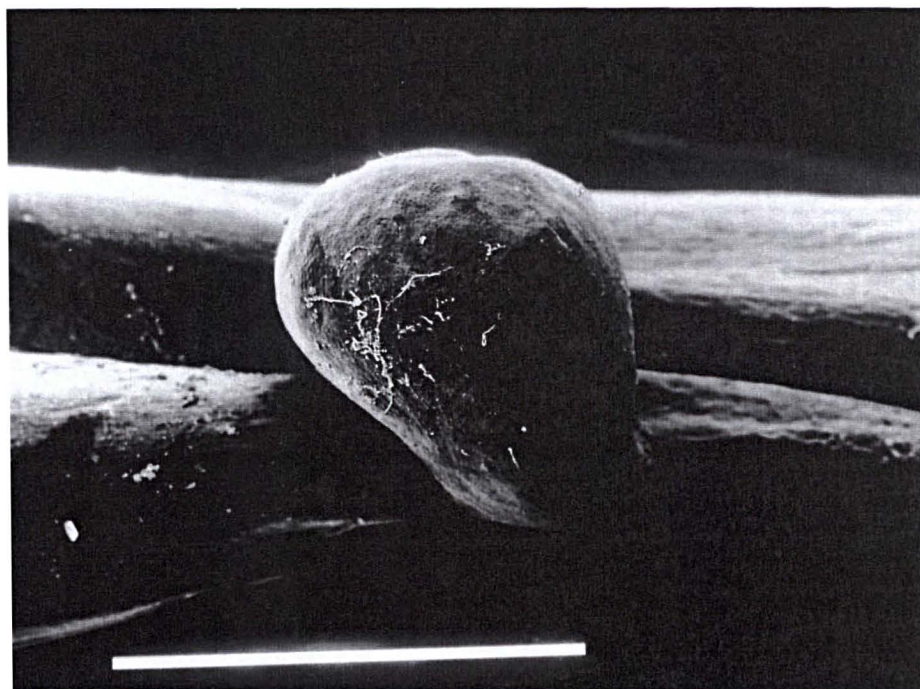


Figura 5. *P. actinia*, respectivas faces adaxial e abaxial mostrando os nectários (setas).

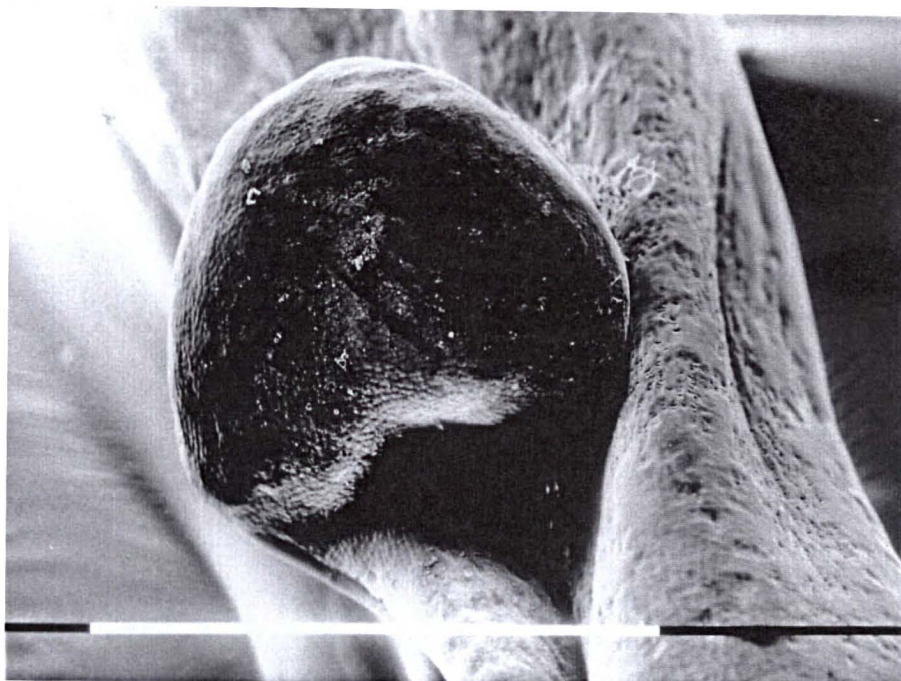


**Figura 6.** Nectário extrafloral, localizado no pecíolo (MEV 51x).



**Figura 7.** Nectário do pecíolo (MEV 58x).



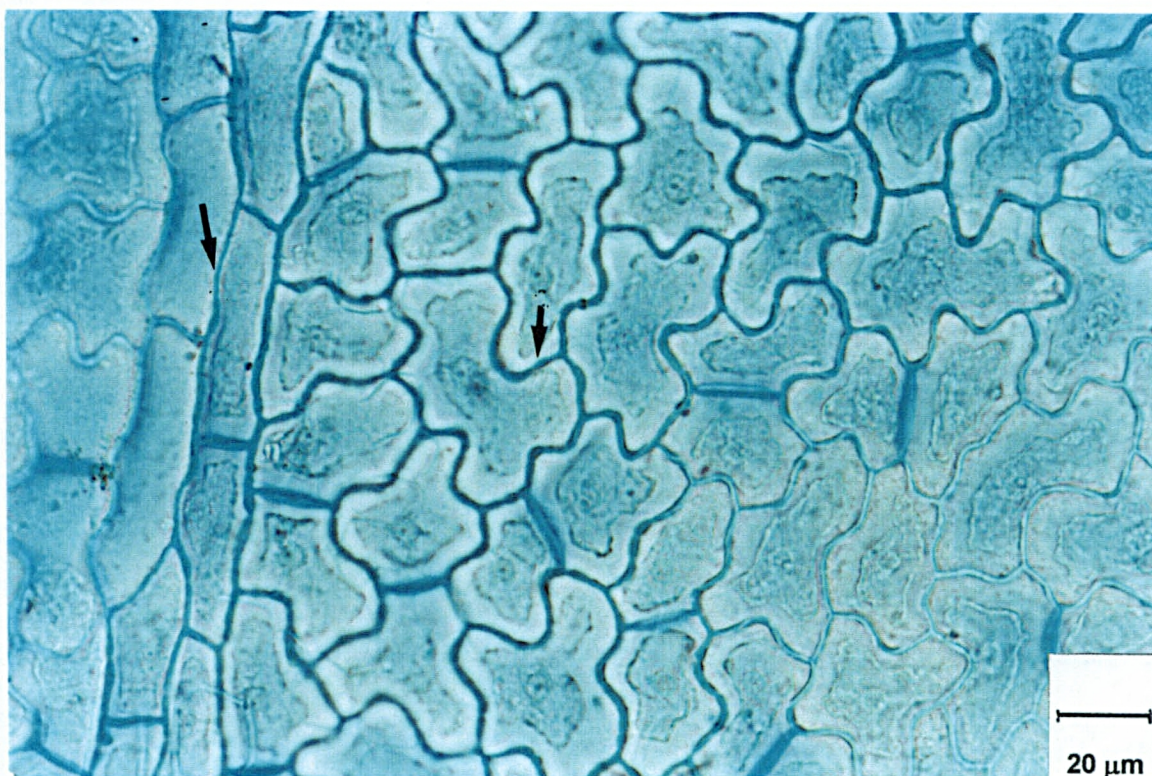


**Figura 8.** Nectário do pecíolo (MEV 70x).

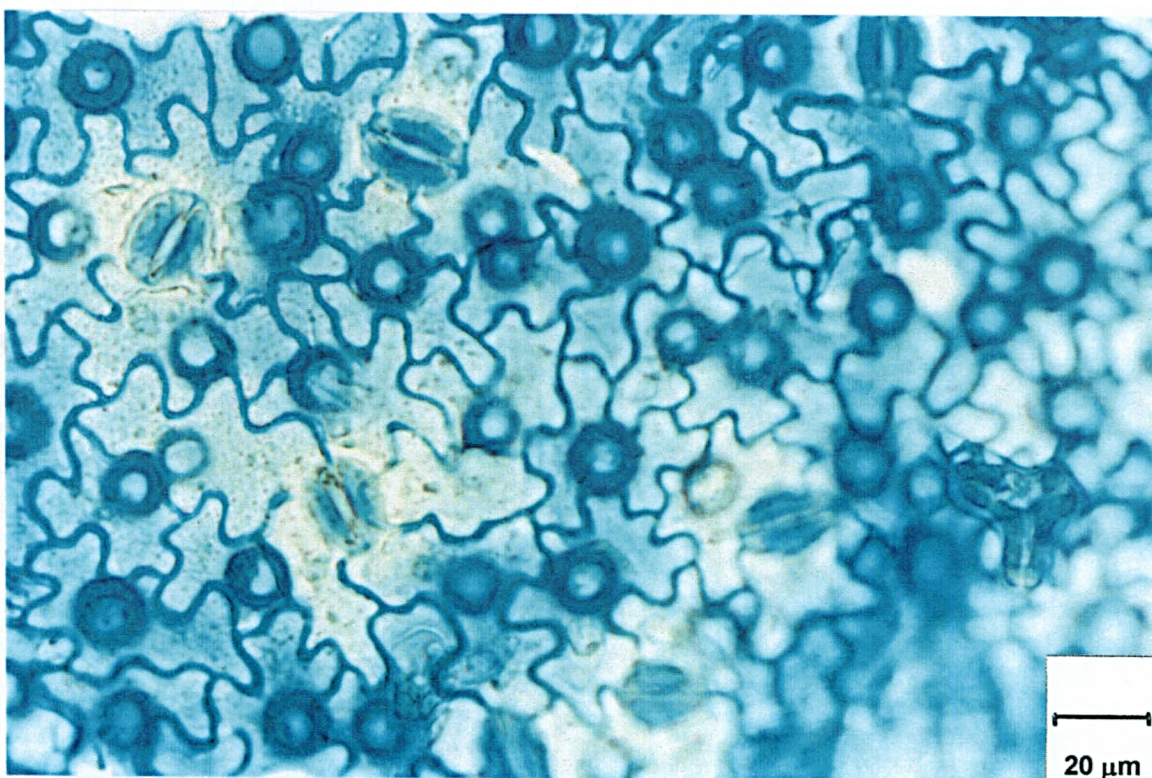
**- Lâmina foliar**

Em vista frontal, as células epidérmicas da região internervural da face adaxial apresentam formato levemente sinuoso, enquanto que, sobre as nervuras assumem formato poligonal (Fig. 9). Na face abaxial as células são comparativamente mais sinuosas e apresentam papilas proeminentes (Fig. 10). Em ambas as faces, a cutícula que reveste a epiderme é relativamente delgada e levemente estriada (Fig. 15) e apresenta cera epicuticular com o aspecto de pequenas escamas (Fig. 11 a 13). Somente a face abaxial possui complexos estomáticos, caracterizando a folha como hipoestomática (Fig. 10, 12, 13). Estes encontram-se inseridos no mesmo nível que as demais células epidérmicas (Fig. 14), sendo do tipo anomocítico, ladeados por três a quatro células, as quais algumas vezes não são papilosas (Fig. 10).



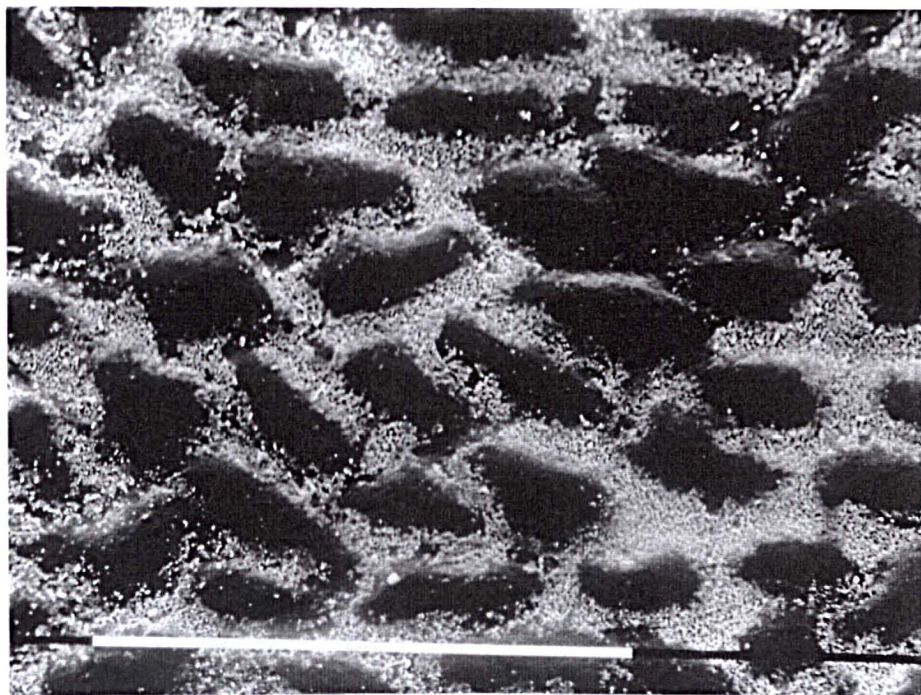


**Figura 9.** *P. actinia*, vista frontal das células epidérmicas da face adaxial, indicando o formato sinuoso na região internervural e poligonal sobre as nervuras (setas).

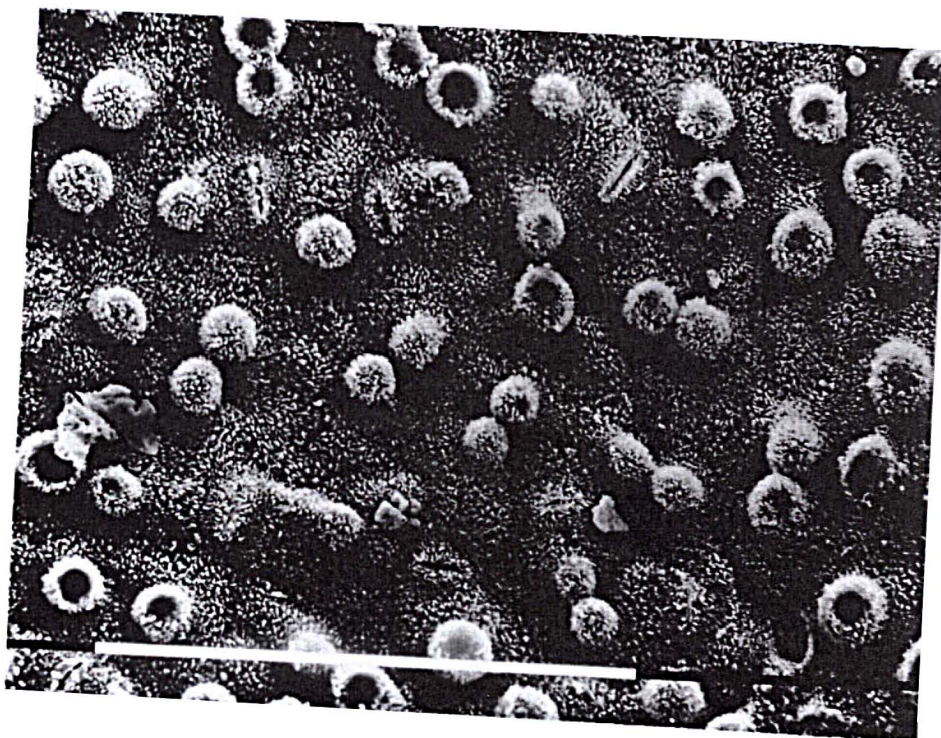


**Figura 10.** *P. actinia*, vista frontal das células epidérmicas da face abaxial, mostrando o formato sinuoso e o aspecto papiloso, e estômatos anomocíticos.



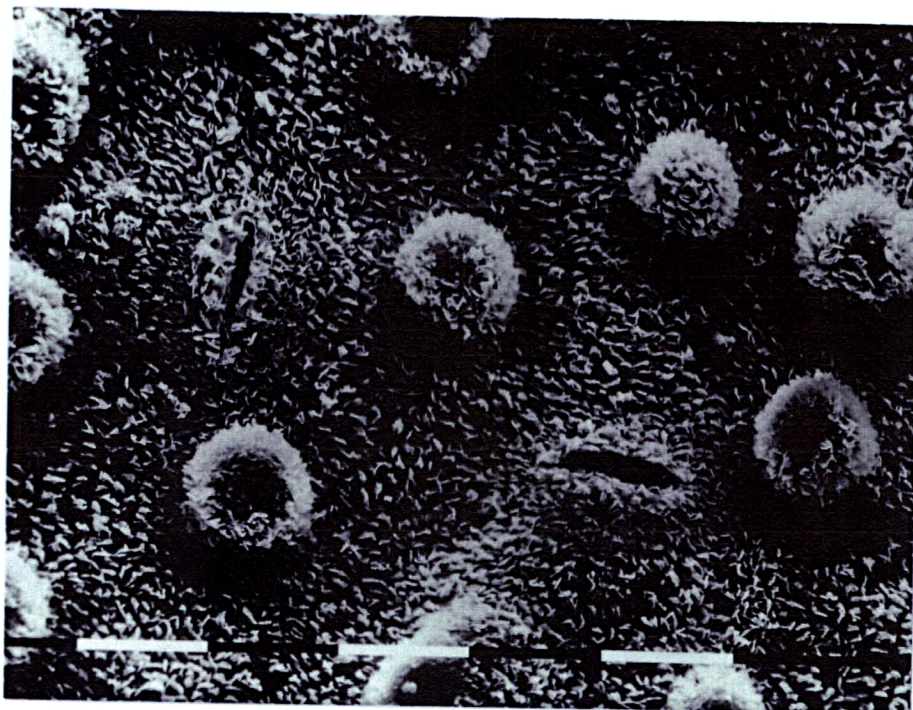


**Figura 11.** *P. actinia*, vista frontal da epiderme foliar, face adaxial, mostrando cera epicuticular (MEV 675x).

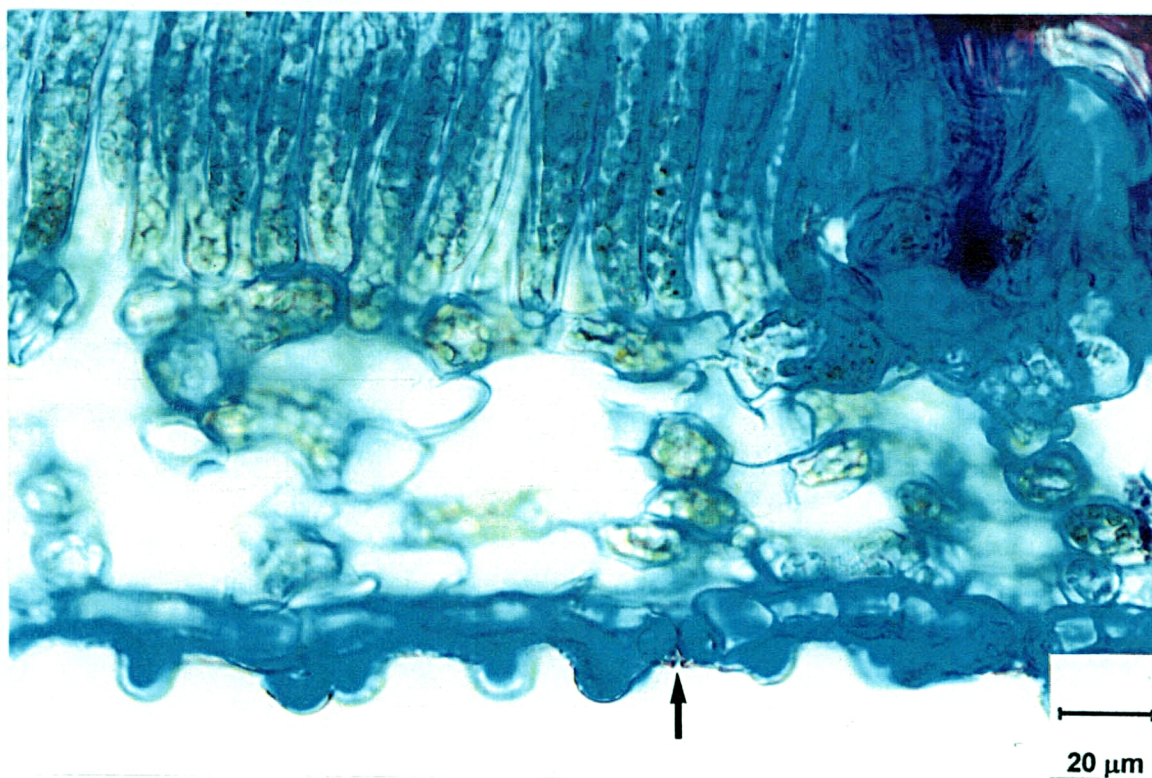


**Figura 12.** *P. actinia*, vista frontal da epiderme foliar, face abaxial, evidenciando cera epicuticular, com aspecto de pequenas escamas (MEV 675x).



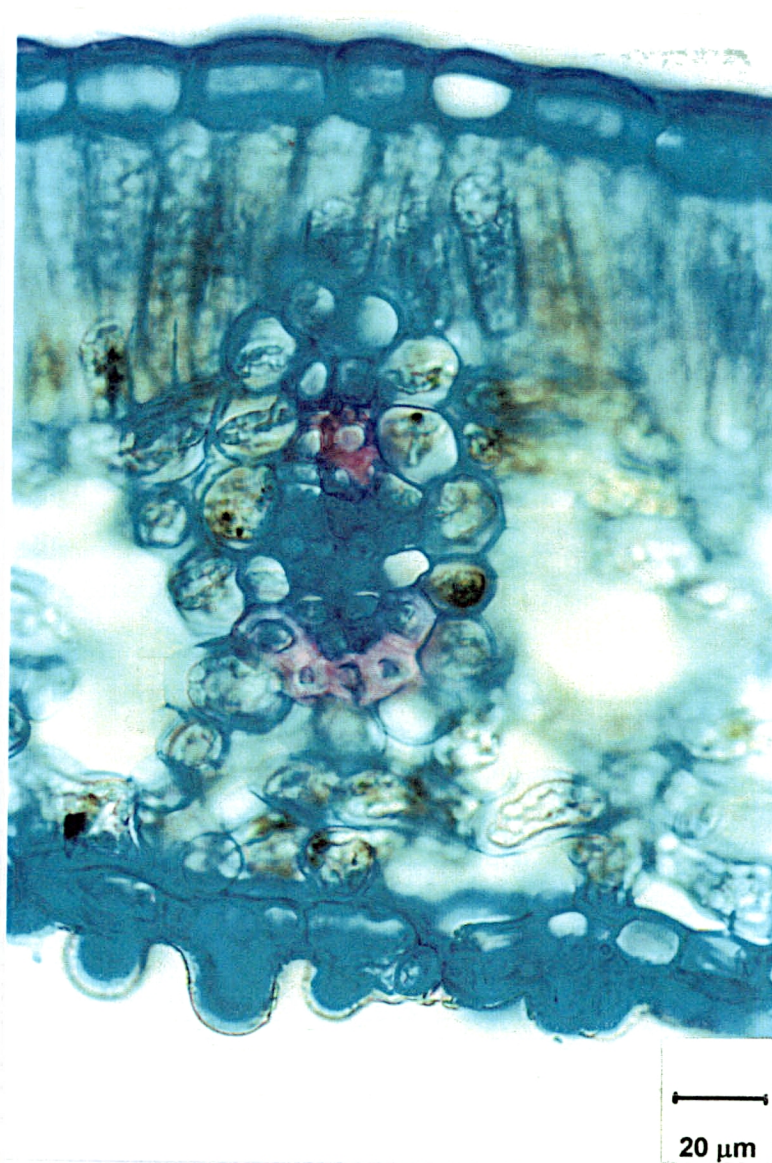


**Figura 13.** Detalhe da figura anterior (MEV 1597x)



**Figura 14.** *P. actinia*, secção transversal da lâmina foliar, onde são observados estômatos na face abaxial, inseridos no mesmo nível das demais células epidérmicas (seta).





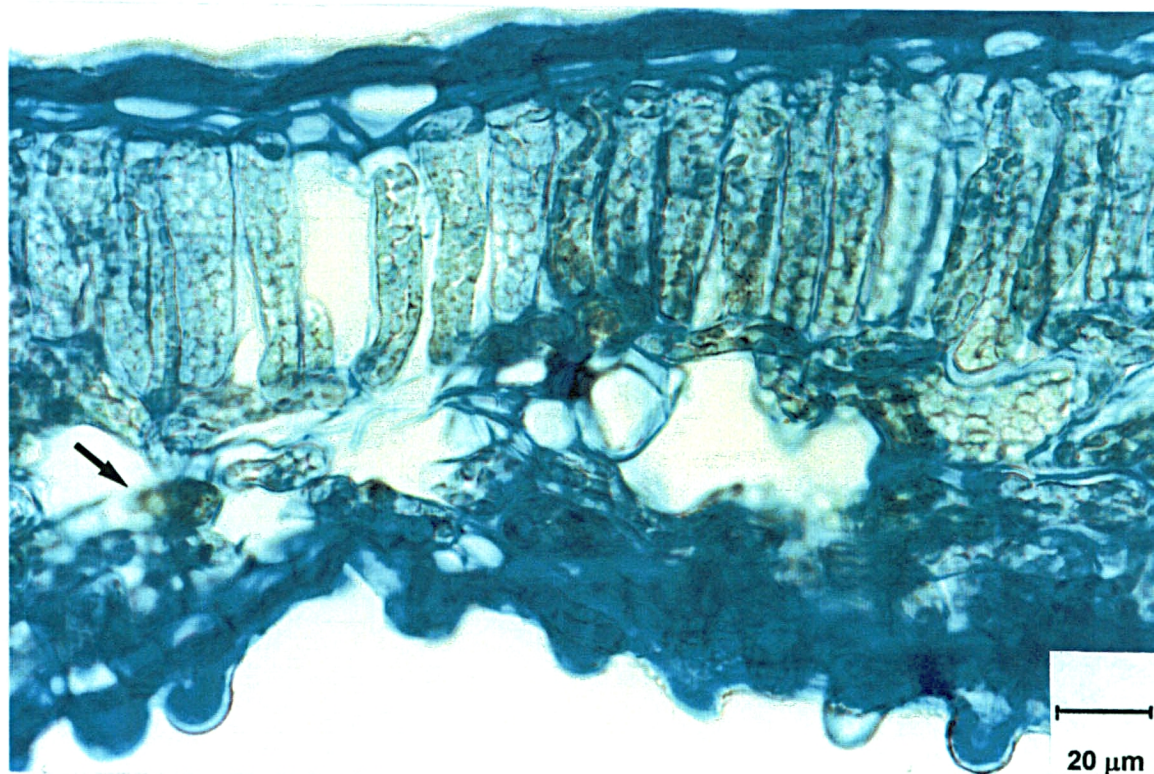
**Figura 15.** *P. actinia*, secção transversal da lâmina foliar, destacando a epiderme uniestratificada e um feixe vascular de pequeno porte circundado por bainha parenquimática e apresentando calota de fibras perivasculares aposta ao floema.

A epiderme é uniestratificada e, em secção transversal, em ambas as faces, as células são alongadas no sentido periclinal (Fig. 15).

O mesofilo possui organização dorsiventral ou bifacial (heterogêneo e assimétrico), sendo caracterizado por uma camada de parênquima paliçádico e cerca de seis estratos de células compondo o parênquima lacunoso. As células do parênquima paliçádico têm formato tipicamente alongado e estreito e as

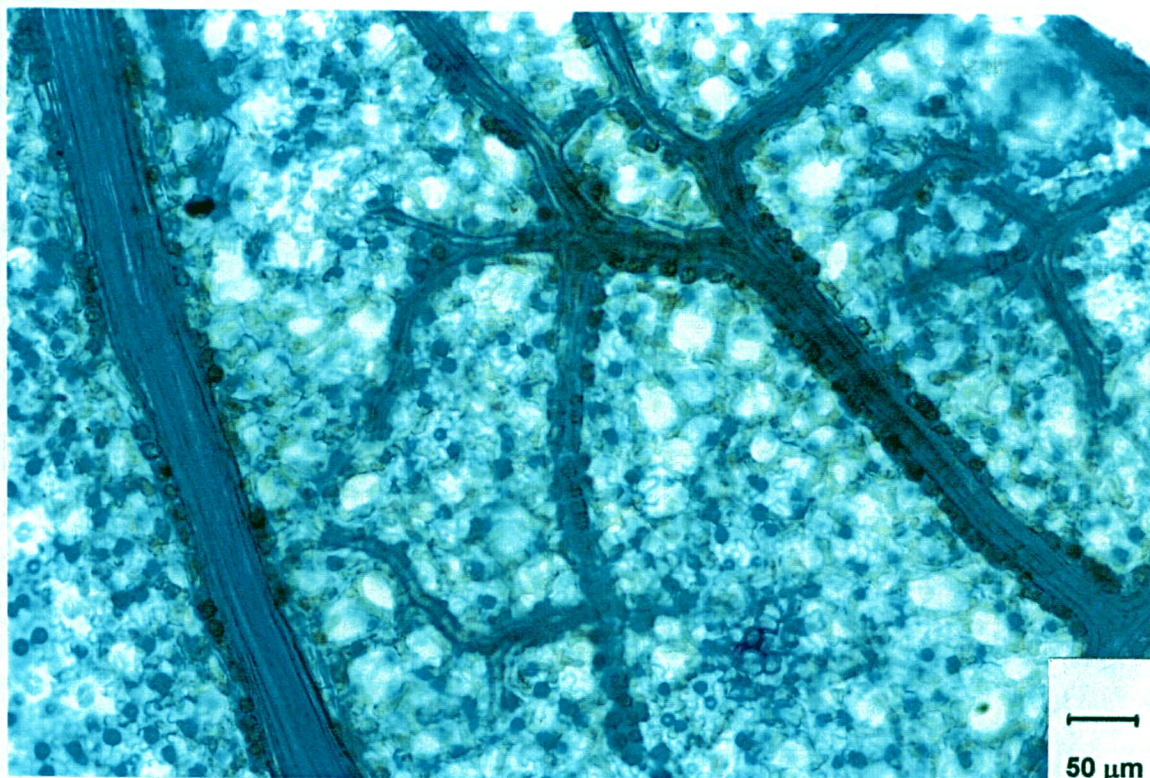


células do parênquima lacunoso são lobadas, com pequenos prolongamentos que formam meatos (Fig. 15, 16). Em toda a lâmina foliar pode-se observar a presença de idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio (Fig. 16). Os feixes vasculares de pequeno porte (Fig. 15) são colaterais e envolvidos por uma bainha parenquimática, podendo conter drusas de oxalato de cálcio e constituir uma bainha cristalífera (Fig. 17); observa-se ainda a presença de uma calota de fibras perivasculares apostas ao floema.



**Figura 16.** *P. actinia*, secção transversal da lâmina foliar, onde se notam o mesofilo dorsiventral e idioblasto contendo drusa de oxalato de cálcio (seta).





**Figura 17.** *P. actinia*, vista frontal do limbo mostrando a nervação foliar constituída por feixes vasculares envoltos por bainha cristalífera.

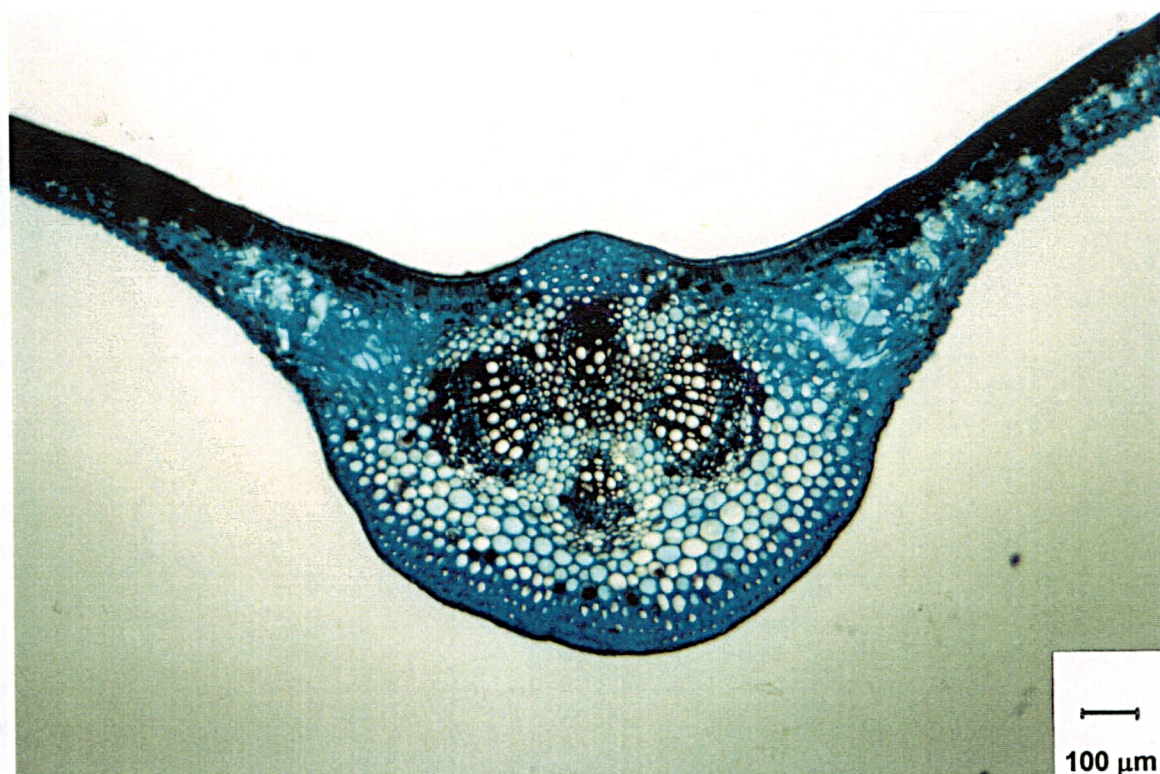
#### **- Nervura mediana**

Em secção transversal, a nervura mediana apresenta formato biconvexo com maior proeminência junto à face abaxial (Fig. 18). A epiderme apresenta-se composta por uma única camada de células alongadas periclinalmente, as quais não se mostram papilosas. A epiderme da nervura mediana é revestida por uma cutícula relativamente delgada (Fig. 19), que apresenta cera epicuticular com o aspecto de pequenas escamas (Fig. 20). Contiguamente à epiderme, em ambas as faces, encontra-se uma região de colênquima angular composta por cerca de três a cinco camadas (Fig. 19, 21, 22).

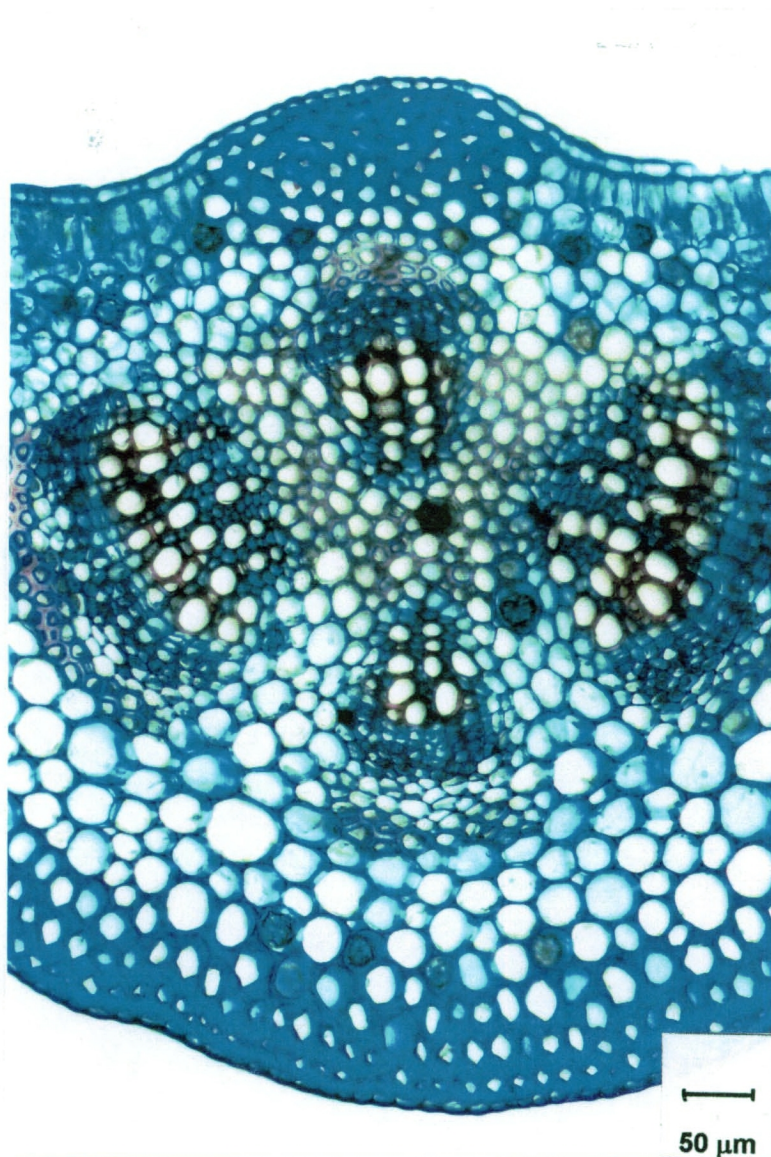
No parênquima fundamental, notam-se idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio e feixes vasculares do tipo colateral com calota de fibras



perivasculares apostas ao floema. Esses feixes apresentam formato aproximadamente circular, em número de quatro, e se dispõem segundo um anel, onde o xilema está voltado para o centro e o floema para a periferia, em disposição centrípeta e centrífuga, respectivamente (Fig. 18, 19). No xilema, os elementos condutores dispõem-se radialmente, estando separados por uma fileira de células que constituem os raios parenquimáticos. A zona cambial e os elementos que constituem o floema são também observados (Fig. 23). A região medular é composta de células levemente lignificadas.

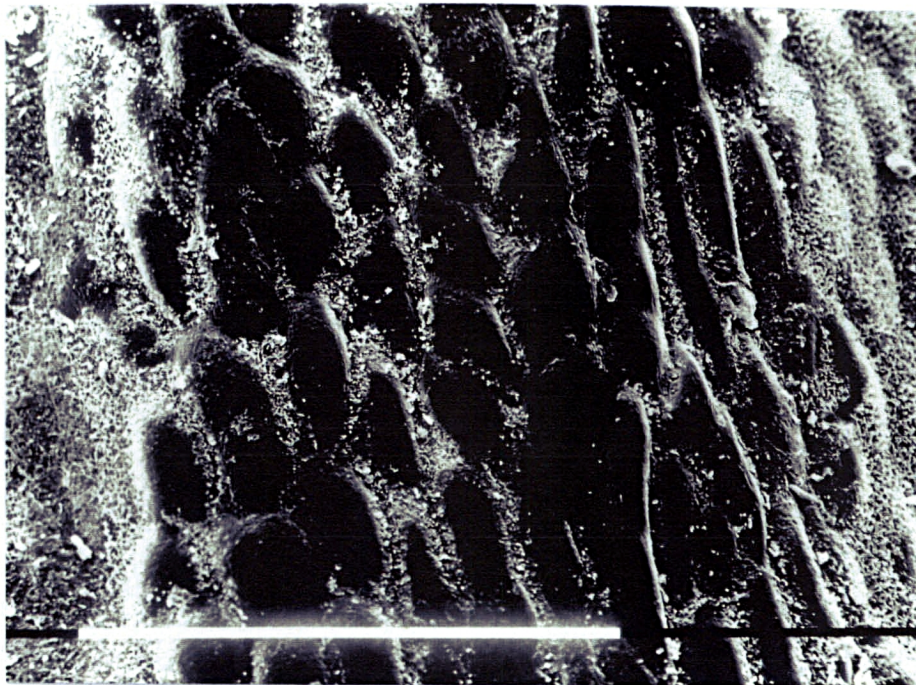


**Figura 18.** *P. actinia*, secção transversal da nervura mediana, evidenciando o formato biconvexo mais proeminente na face abaxial.

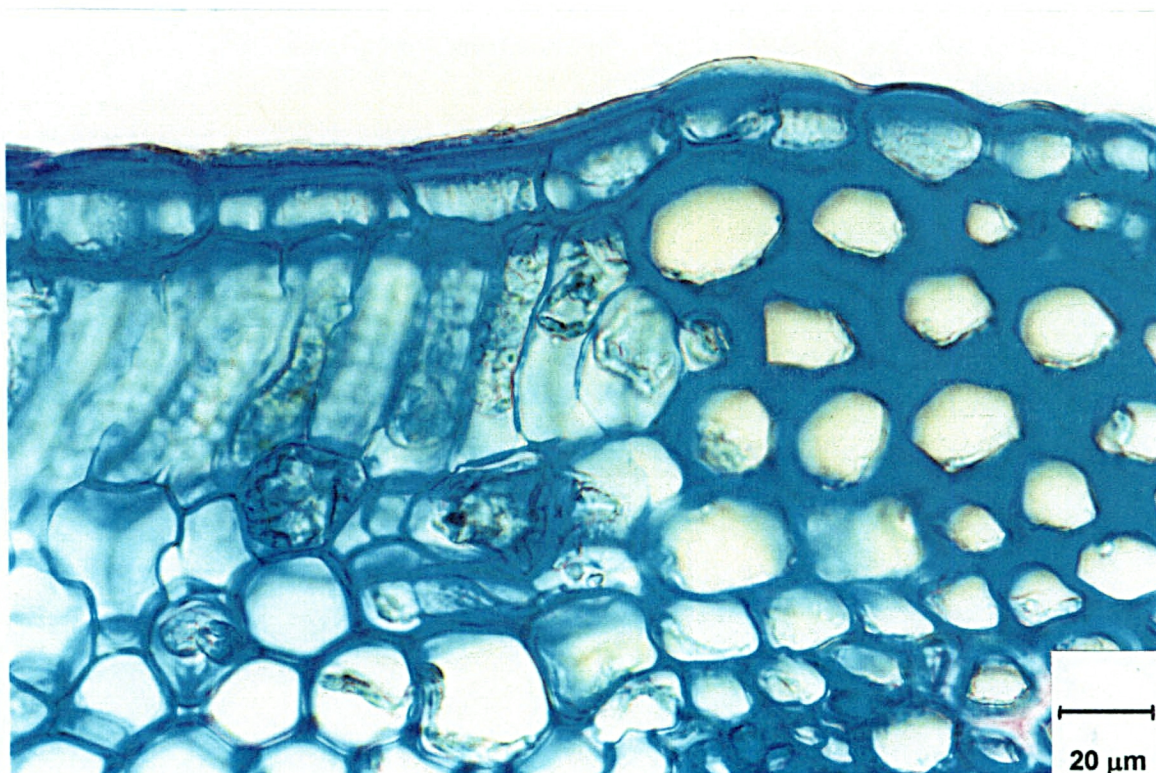


**Figura 19.** *P. actinia*, secção transversal da nervura mediana, destacando o colênquima angular e feixes vasculares estabelecendo uma região medular levemente lignificada.



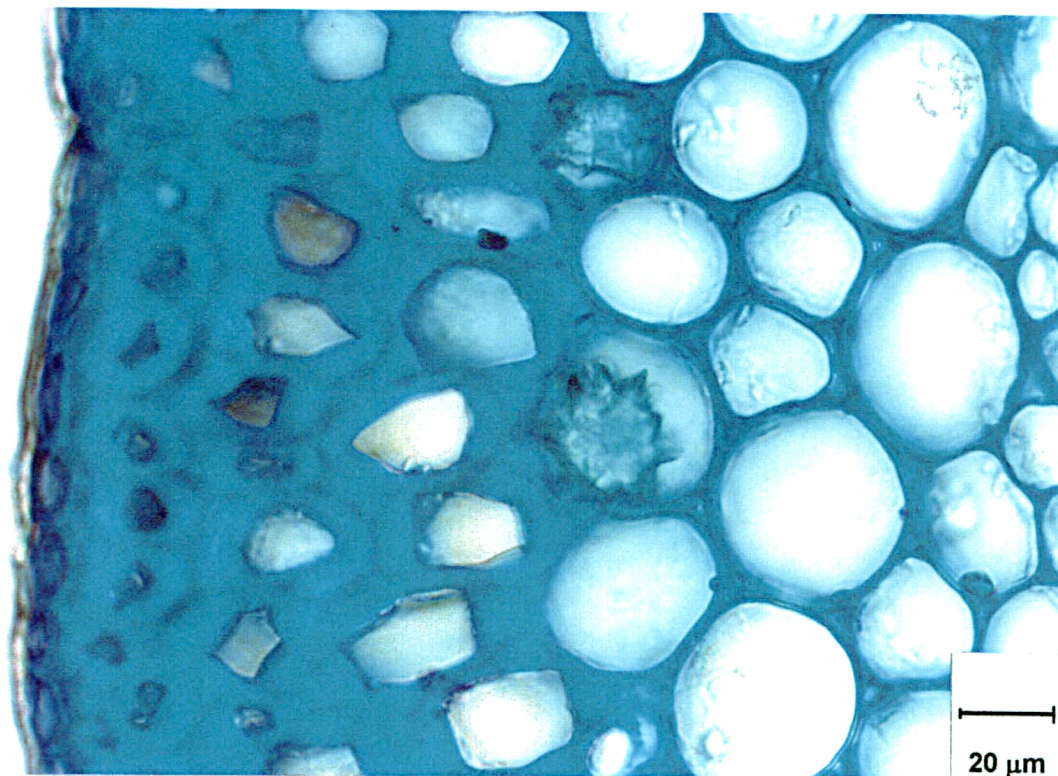


**Figura 20.** *P. actinia*, vista frontal da epiderme foliar sobre a nervura mediana, revelando a presença de cera epicuticular (MEV 675x).

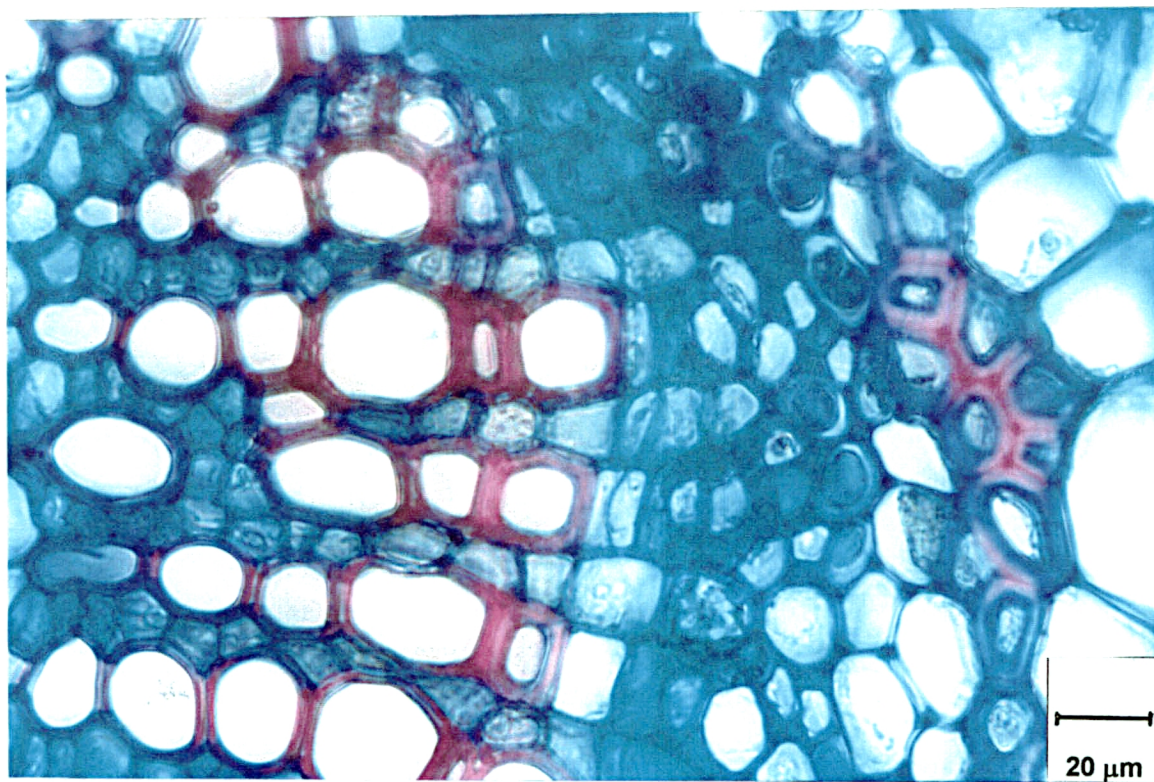


**Figura 21.** *P. actinia*, secção transversal da nervura mediana junto à face adaxial, evidenciando colênquima angular e idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio.





**Figura 22.** *P. actinia*, secção transversal da nervura mediana, face abaxial, onde se notam colênquima angular e idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio.

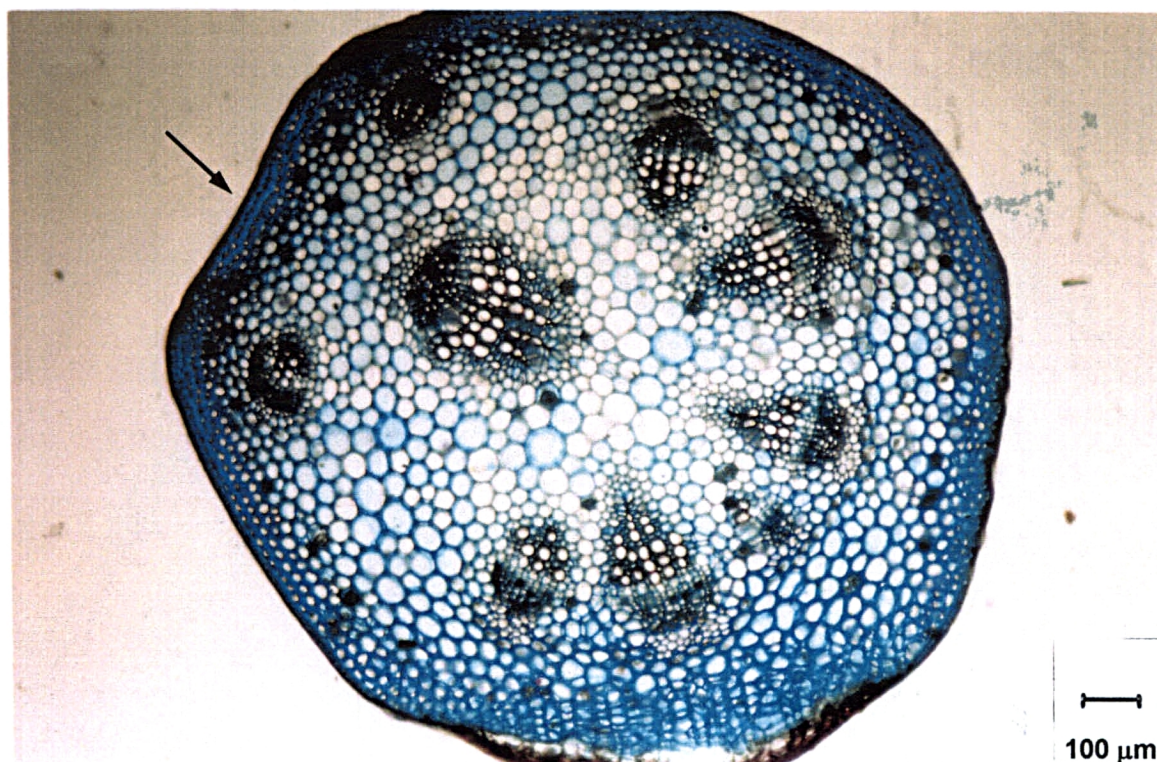


**Figura 23.** *P. actinia*, detalhe do feixe vascular da nervura mediana, em secção transversal, observando-se o xilema, a zona cambial e a calota de fibras perivasculares apostas ao floema.



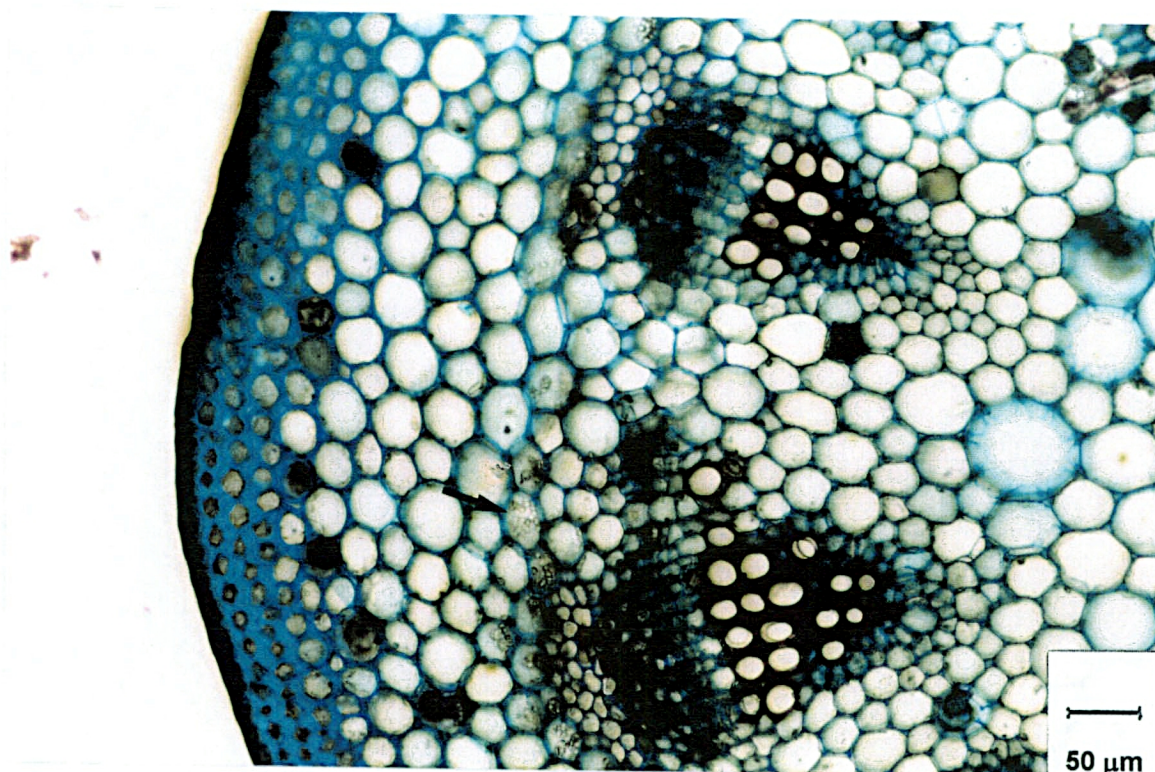
### - Pecíolo

Em secção transversal, o pecíolo apresenta o formato praticamente arredondado, sendo levemente achatado na face adaxial (Fig. 24). As células epidérmicas possuem forma poligonal em vista frontal; em secção transversal, observa-se que se dispõem em um único estrato e são revestidas por cutícula relativamente espessada e levemente estriada. Subjacentemente à epiderme nota-se uma faixa contínua de colênquima angular, o qual é composto de cerca de quatro estratos (Fig. 24 a 26).

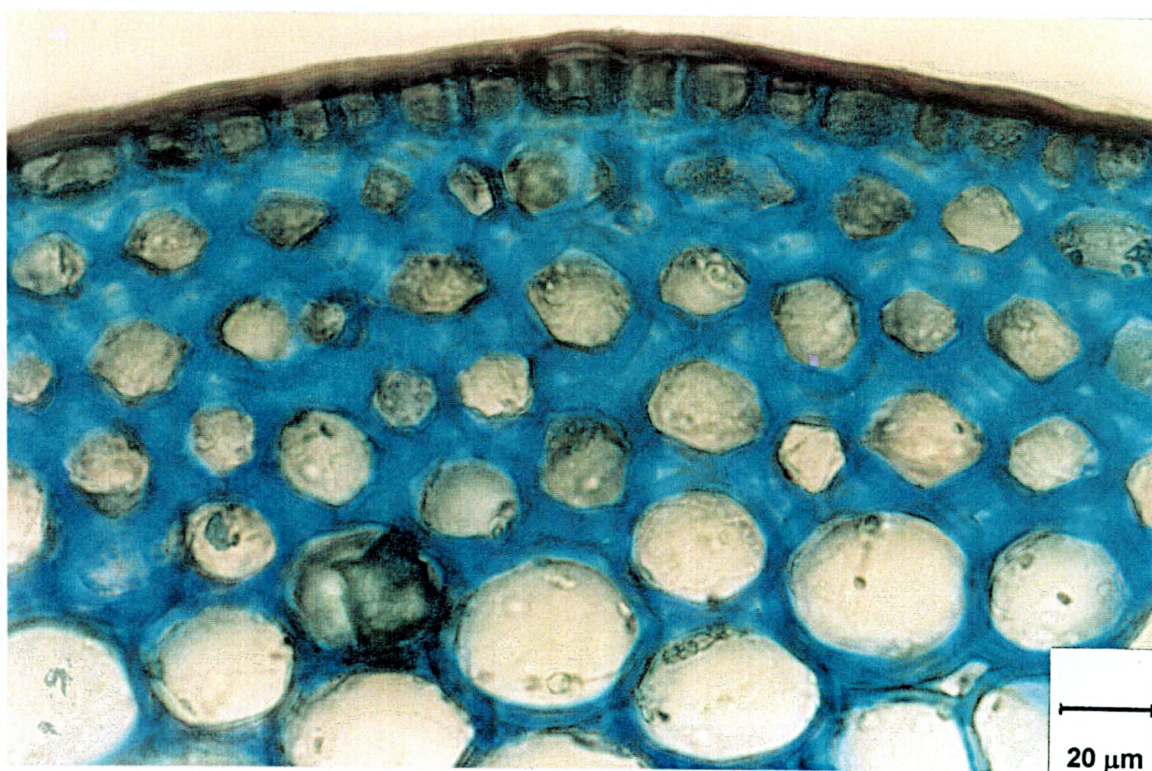


**Figura 24.** *P. actinia*, secção transversal do pecíolo, que apresenta o formato praticamente arredondado, sendo levemente achatado na face adaxial (seta).





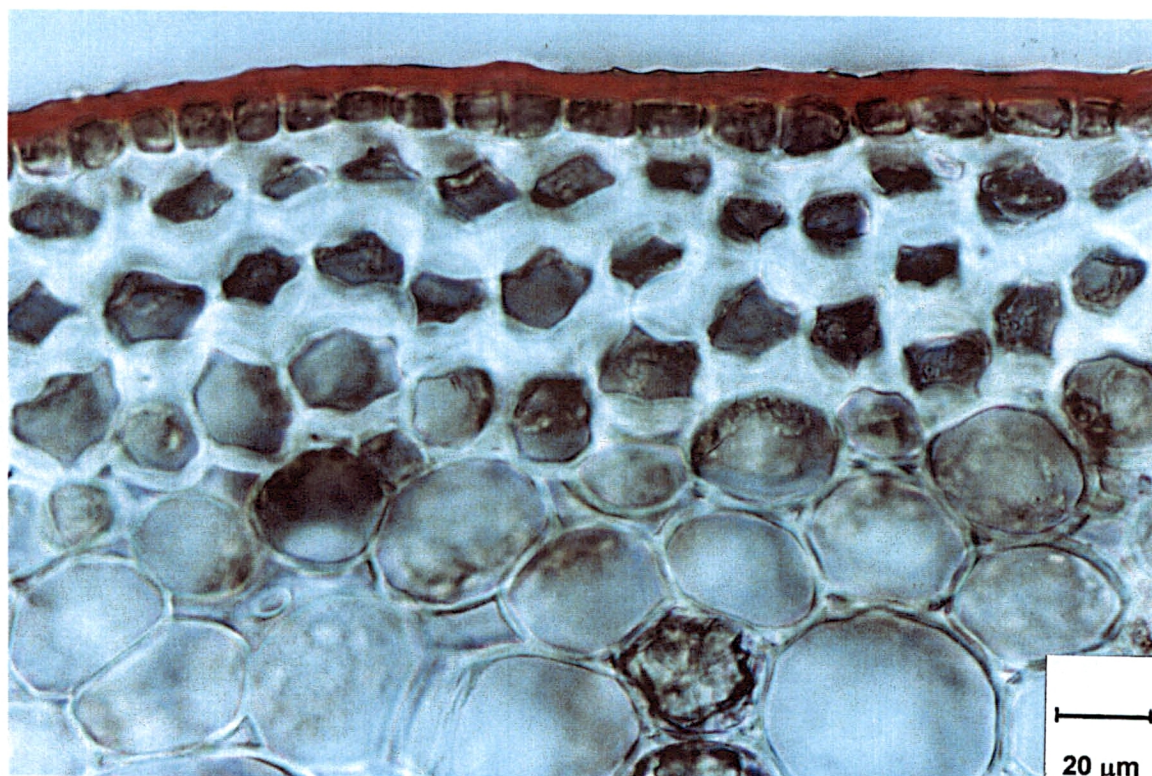
**Figura 25.** *P. actinia*, pormenor da foto anterior, destacando colênquima angular, idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio, feixes vasculares colaterais e bainha amilífera (seta).



**Figura 26.** *P. actinia*, secção transversal do pecíolo, indicando a cutícula relativamente espessada e estriada, o colênquima angular e idioblasto contendo drusa de oxalato de cálcio.

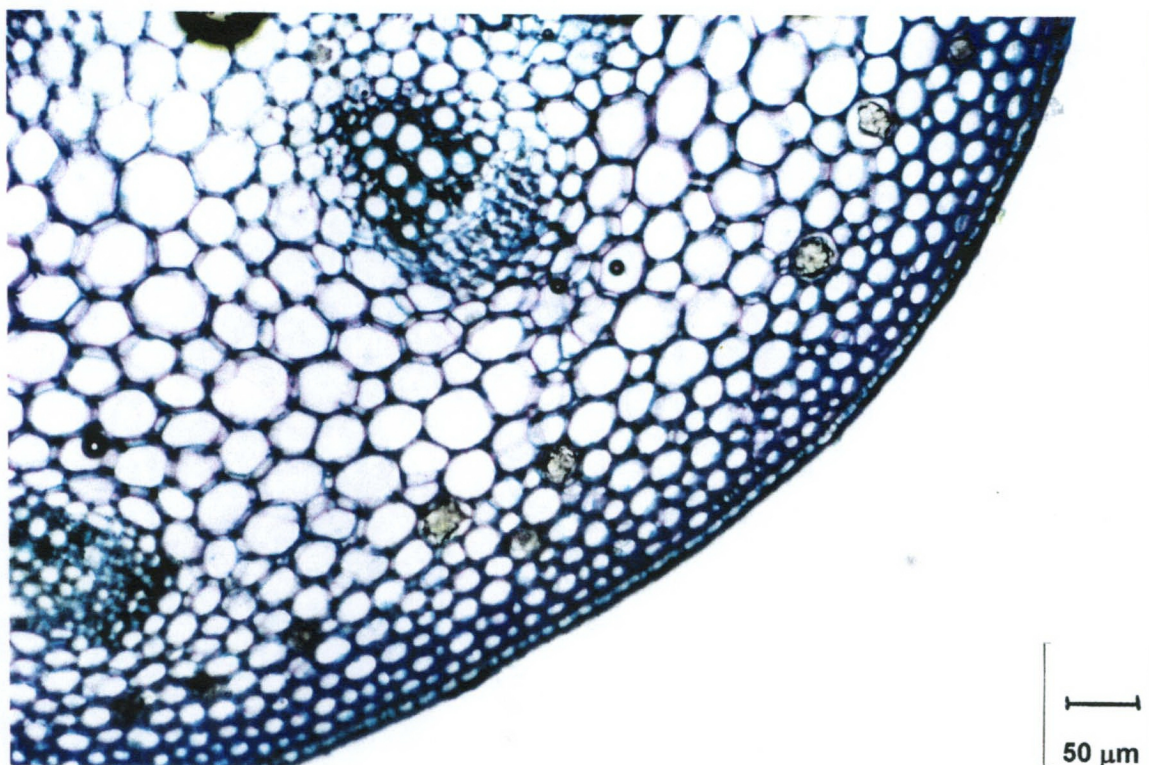


Mergulhados no parênquima fundamental, aproximadamente sete feixes vasculares do tipo colateral encontram-se dispostos em forma de anel. Próximo à face adaxial, dois outros feixes menores podem ser encontrados (Fig. 24). A disposição do floema é centrífuga, enquanto que o xilema tem disposição centrípeta, sendo evidente uma zona cambial. Os elementos condutores do xilema dispõem-se radialmente, estando separados por uma fileira de células parenquimáticas. A calota de fibras perivasculares está situada de maneira aposta ao floema e pode ser encontrada em diferentes estágios de lignificação (Fig. 24, 25). No parênquima fundamental observam-se idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio (Fig. 25 a 28) e amiloplastos constituindo uma bainha amilífera (Fig. 25, 29).

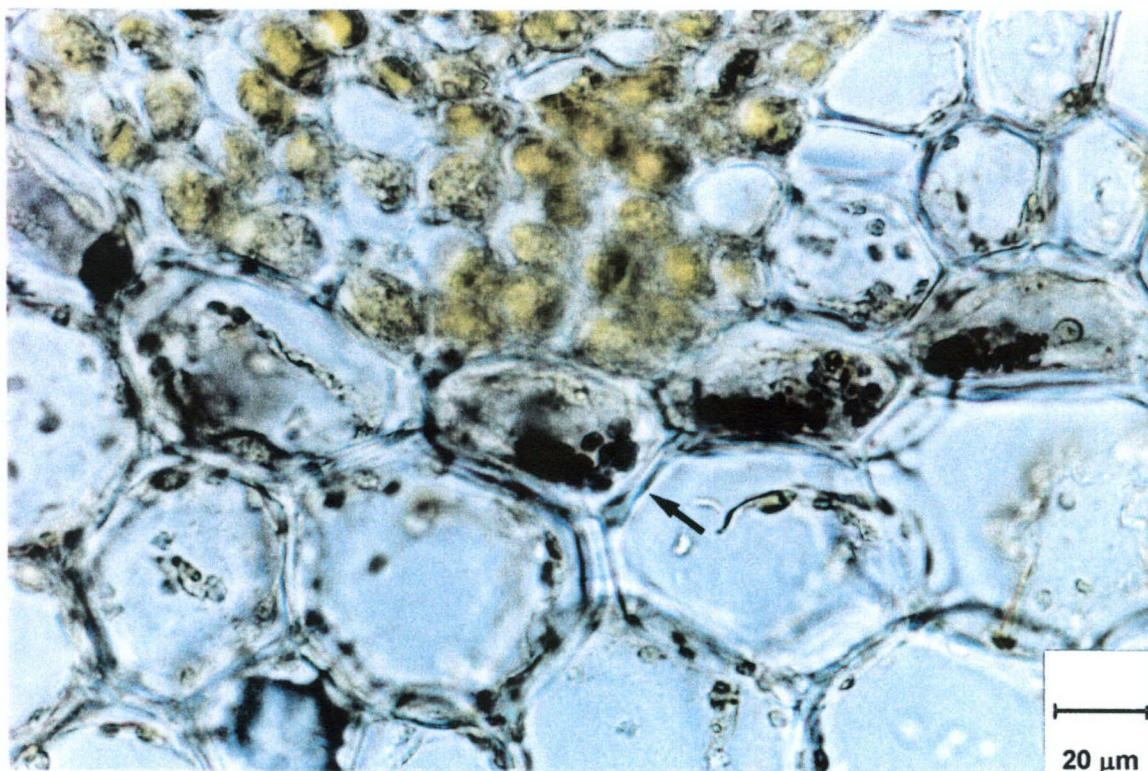


**Figura 27.** *P. actinia*, secção transversal do pecíolo, caracterizando a cutícula relativamente espessada após reação com Sudam III e idioblasto contendo drusa de oxalato de cálcio.





**Figura 28.** *P. actinia*, secção transversal do pecíolo onde se observam idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio.



**Figura 29.** *P. actinia*, secção transversal do pecíolo, destacando a presença de amiloplastos que constituem uma bainha amilífera, evidenciados pela reação com glicerina iodada (seta).

## Desenvolvimento da formulação

O elixir de maracujá foi desenvolvido com a espécie *P. alata*, e os resultados dos ensaios realizados estão sumarizados nas tabelas a seguir:

### - Controle farmacognóstico da droga

**Tabela 1.** Resultados dos ensaios efetuados para o controle farmacognóstico da droga:

ENSAIOS	MÉDIA E DESVIO PADRÃO
Cinzas totais (%)	8,72 $\pm$ 0,03
Cinzas insolúveis em ácido (%)	1,52 $\pm$ 0,04
Perda de água por dessecação (%)	6,60 $\pm$ 0,06
Doseamento de flavonóides totais (%)	0,38 $\pm$ 0,02

As características organolépticas observadas na droga foram: cor: folhas verde-escuro e caules bege; odor: inodoro; aspecto: rasurado. As características morfo-anatômicas foram correspondentes à descrição para *P. alata* (F.BRAS. III, 1977 ; FREITAS, 1985; OLIVEIRA; AKISUE, 1998).

### - Desenvolvimento tecnológico

**Tabela 2.** Resultados dos ensaios realizados para a avaliação da tintura de maracujá no tempo zero:

ENSAIOS	MÉDIA E DESVIO PADRÃO
Título etanólico (°GL)	36,30 $\pm$ 0,57
Resíduo seco (%)	2,45 $\pm$ 0,35
Densidade (g/ml)	0,9601 $\pm$ 0,00
pH	5,95 $\pm$ 0,04

As características organolépticas observadas na tintura de maracujá estão indicadas abaixo: cor: verde escura; odor: alcoólico; aspecto: límpido; sabor: amargo.

**Tabela 3.** Resultados dos ensaios realizados para avaliação do elixir de maracujá, no tempo zero:

ENSAIOS	MÉDIA E DESVIO PADRÃO
Título etanólico (°GL)	11,72 ±0,48
Densidade (g/ml)	1,2333 ±0,00

#### - Estabilidade física

**Tabela 4.** Resultados dos ensaios de viscosidade aparente seguidos à preparação do elixir, em temperatura ambiente:

TEMPO ZERO	VISCOSIDADE APARENTE (cP)
Velocidades (rpm)	Média e desvio padrão
100	30,88 ±0,29
60	28,80 ±0,00

**Tabela 5.** Resultados das determinações de pH e características organolépticas em temperatura ambiente, no tempo zero

AMOSTRA	DETERMINAÇÃO DE pH	CARACTERÍSTICAS
	Média e desvio padrão	ORGANOLÉPTICAS
Elixir de maracujá	6,53 ±0,19	<sup>(1)</sup> 00

(1)-Características organolépticas 00 – formulação sem alterações, conforme as características iniciais (cor: amarelo clara, sabor: alcoólico adocicado e aspecto: límpido e viscoso), considerando o valor 10 como o maior índice de alteração.

**Tabela 6.** Resultados dos ensaios de viscosidade aparente em temperaturas de 50°C e de 40°C, após a primeira e segunda semanas de armazenamento:

ELIXIR DE MARACUJÁ	VISCOSIDADE APARENTE _ (cP)			
	Primeira semana		Segunda semana	
	50°C	40°C	50°C	40°C
Velocidade (rpm)	Média e desvio padrão	Média e desvio padrão	Média e desvio padrão	Média e desvio padrão
100	25,77 ±0,75	25,40±1,28	28,53±0,75	27,93 ±0,60
60	23,40 ±0,90	24,63 ±1,27	25,13 ±0,75	24,90 ±0,85

**Tabela 7.** Resultados das determinações de pH e características organolépticas em temperatura de 50°C e 40°C, após a primeira semana:

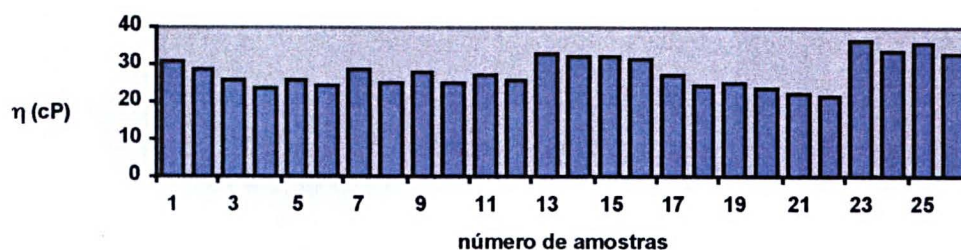
AMOSTRA	DETERMINAÇÃO DO pH		CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	
	50°C	40°C		
	Média e desvio padrão	Média e desvio padrão	50°C	40°C
Elixir de maracujá	6,04 ±0,22	6,02 ±0,13	<sup>(2)</sup> 6,5	<sup>(2)</sup> 3,5

(2)-Devido às alterações observadas durante os ensaios organolépticos a partir da primeira semana, a mesma avaliação não foi efetuada nas semanas seguintes, em temperaturas de 50°C e de 40°C, bem como os ensaios de pH e de viscosidade aparente.

**Tabela 8.** Resultados da estabilidade física, em temperatura ambiente:

VISCOSIDADE APARENTE (cP)		DETERMINAÇÃO DO pH	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS
Velocidade (rpm)	Média e desvio padrão	Média e desvio padrão	
1º mês		5,80 ±0,26	00
100	27,30 ±1,82		
60	25,40 ±2,75		
2º mês		6,23 ±0,21	00
100	32,80 ±3,34		
60	32,10 ±0,96		
3º mês		6,47 ±0,47	01
100	31,80 ±0,92		
60	31,30 ±1,31		
4º mês		6,20 ±0,49	01
100	27,30 ±2,26		
60	24,20 ±0,36		
5º mês		6,05 ±0,23	01
100	24,70 ±0,20		
60	23,30 ±0,46		
6º mês		5,82 ±0,31	02
100	22,50 ±0,92		
60	21,7 ±1,30		
7º mês		6,40 ±0,03	02
100	36,50 ±1,04		
60	33,30 ±0,98		
8º mês		6,42 ±0,03	03
100	36,00 ±0,36		
60	33,10 ±0,26		

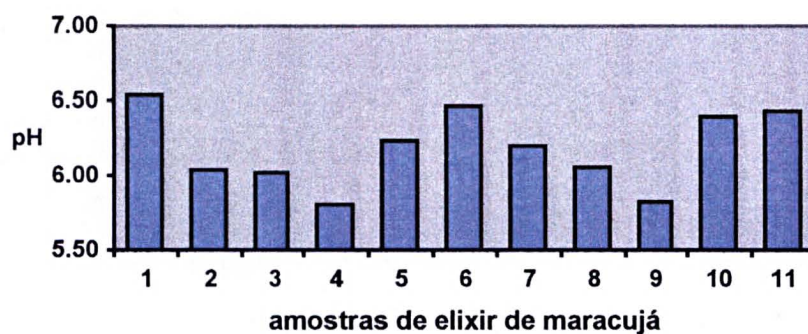




Amostras:

1- Tempo zero, temperatura ambiente, 100 rpm; 2- 60 rpm; 3- a 50°C, após uma semana a 100 rpm; 4- a 60 rpm; 5- 40°C, após uma semana a 100 rpm; 6- a 60 rpm; 7- 50°C, após duas semanas, a 100 rpm; 8- a 60 rpm; 9- 40°C, após duas semanas a 100 rpm; 10- a 60 rpm; 11- Temperatura ambiente, após um mês a 100 rpm; 12- a 60 rpm; 13- dois meses a 100 r.p.m; 14- a 60 rpm; 15- três meses a 100 rpm; 16- a 60 rpm; 17- quatro meses a 100 rpm; 18- a 60 rpm; 19- cinco meses a 100 rpm; 20- a 60 rpm; 21- seis meses a 100 rpm; 22- a 60 rpm; 23- sete meses a 100 rpm; 24- a 60 rpm; 25- oito meses a 100 rpm; 26- a 60 rpm

**Figura 30.** Valores médios de viscosidade aparente em amostras de elixir de maracujá.



Amostras:

1- Tempo zero, temperatura ambiente; 2- Estocagem a 50°C, avaliação após uma semana; 3- A 40°C, após uma semana; 4- Temperatura ambiente, após um mês; 5- dois meses; 6- três meses; 7- quatro meses; 8- cinco meses; 9- seis meses; 10- sete meses; 11- oito meses.

**Figura 31.** Valores médios de pH em amostras de elixir de maracujá.

### - Estabilidade microbiológica

**Tabela 9.** Resultados do controle microbiológico do elixir no tempo zero e após oito meses de estocagem em prateleira, à temperatura ambiente, em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em 1ml de elixir:

MICROORGANISMOS	TEMPO ZERO	APÓS OITO MESES
	UFC/ml	UFC/ml
Aeróbios totais	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$
Bolores e leveduras	< 10	< 10
Enterobactérias	Ausência	Ausência
<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausência
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência	Ausência
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	Ausência
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausência

## DISCUSSÃO

---

### Estudo morfo-anatômico

#### - Estudo morfológico externo

As folhas são expansões laterais do caule (OLIVEIRA; AKISUE, 1998) e desempenham uma especializada função, a fotossíntese (EAMES; MacDANIELS, 1947). Estes mesmos autores e CUTTER (1987) descrevem que, morfológicamente, as folhas podem apresentar grandes variações de tamanho e de forma.

As folhas analisadas de *Passiflora actinia* Hook., Passifloraceae também foram morfológicamente estudadas por CERVI (1981), o qual relatou o hábito escandente da espécie, e por CORRÊA (1984), sendo que ambas descrições foram coincidentes com as encontradas no presente trabalho.

No pecíolo da mesma espécie, foi detectada a presença de dois ou três pares de nectários, que são glândulas nectaríferas comumente encontradas em pecíolos de espécies de *Passiflora*, segundo FAHN (1982). Essas glândulas podem secretar substâncias açucaradas, na maioria dos casos, ou resinas e outros tipos de secreções, que são atrativas a muitos insetos (CUTTER, 1986; METCALFE; CHALK, 1988). Também foi verificada a presença de estípulas, que vêm a ser uma projeção laminar que pode existir na base dos pecíolos (FERRI et al., 1981), detalhe observado por FREITAS (1985) em *Passiflora alata* Dryander, *Passiflora quadrangularis* L., *Passiflora edulis* Sims. e *Passiflora incarnata* L.



## - Estudo anatômico

### ☐- Lâmina foliar

A epiderme é o sistema de revestimento que durante o crescimento primário envolve todas as partes das plantas (CUTTER, 1986). É de grande importância para a proteção do mesofilo, o qual é de natureza delicada e, no caso do vegetal sofrer alguma injúria, funciona como proteção contra a dessecação. Provavelmente, também auxilia a condução de solutos entre as células do mesofilo e as nervuras (EAMES; MacDANIELS, 1947). Geralmente, a epiderme consiste de uma única camada de células (CUTTER, 1987; METCALFE; CHALK, 1988), que freqüentemente se apresentam de forma tabular (MAUSETH, 1988).

Em *Passiflora actinia*, a epiderme é uniestratificada, sendo que em ambas as faces as células são alongadas periclinalmente. De maneira geral, MAUSETH (1988) menciona que as células da superfície superior (adaxial) normalmente diferem da inferior (abaxial). Fato esse observado em *P. actinia*, onde na face abaxial as células são comparativamente mais sinuosas e são nitidamente papilosas, o que vem a constituir segundo MAUSETH (1988) áreas de denso revestimento cuticular. De acordo com METCALFE e CHALK (1950), essas papilas são comuns em espécies de *Passiflora*, embora não tenham sido detectadas em *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. edulis*. e *P. incarnata* (FREITAS, 1985).

A cutícula é, predominantemente, um depósito de cutina, uma substância hidrofóbica, sobre a superfície da parede celular periclinal externa. Com função protetora, na maior parte mecânica, oferece resistência contra infecções por agentes patogênicos, capaz de concentrar, de difundir ou de refletir os raios ultravioletas do sol (JUNIPER; JEFFREE, 1983), protegendo o vegetal, neste último caso, contra efeitos mutagênicos (MAUSETH, 1988).

Na espécie em questão, a cutícula é relativamente delgada, levemente estriada e apresenta cera epicuticular com o aspecto de pequenas escamas, definido conforme classificação proposta por METCALFE e CHALK (1988). CUTTER (1986) ressalta que o padrão e a quantidade de cera sobre a epiderme afeta o grau de umidade dessa superfície e determina a suscetibilidade da planta

aos herbicidas. A epiderme não é considerada absolutamente impermeável, porque embora a cutícula e a cera depositadas na parede periclinal externa dificultem a entrada e a perda de água, como também a difusão de dióxido de carbono, a natureza desenvolveu um mecanismo de ajuste de permeabilidade, que favorece a troca gasosa – os estômatos (MAUSETH, 1988). Na família das Passifloraceae, estes estão presentes geralmente na superfície inferior da folha, sendo na maioria do tipo ranunculáceo (anomocítico) (METCALFE; CHALK, 1950). Os observados em *P. actinia* coincidem com a descrição anterior, encontram-se inseridos no mesmo nível que as demais células da epiderme e são ladeados por três a quatro células, as quais algumas vezes não são papilosas.

Não foram visualizados tricomas na espécie em questão, fato também constatado por FREITAS (1985), em *P. alata* e *P. quadrangularis*. Esses anexos epidérmicos podem ser utilizados com finalidades taxonômicas (METCALFE; CHALK, 1950).

Nas dicotiledôneas, dois tipos de parênquima clorofiliano podem ser detectados: parênquima paliçádico e parênquima lacunoso ou esponjoso. No primeiro caso, as células são alongadas no sentido transversal da folha, possuem muitos cloroplastos e podem apresentar-se em uma ou mais camadas celulares. O parênquima lacunoso possui células com formato irregular, constituindo grandes espaços intercelulares (EAMES; MacDANIELS, 1947; FAHN, 1982; CUTTER, 1987).

Em *P. actinia* foi observado o mesofilo com organização dorsiventral ou bifacial (heterogêneo e assimétrico), onde o parênquima paliçádico encontra-se voltado à face adaxial e o lacunoso à face abaxial. Nesse caso, FAHN (1982) descreve que a grande maioria dos cloroplastos podem ser detectados no parênquima paliçádico, devido à forma e ao arranjo dessas células que otimizam a utilização da luz para a fotossíntese. Em *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. edulis* e *P. incarnata*, a descrição relatada por FREITAS (1985) a respeito do mesofilo é a mesma descrita para a espécie em estudo.

Muitas plantas armazenam no interior de suas células excessos de materiais inorgânicos constituídos, na maioria das vezes, por sílica e por sais de cálcio (FAHN, 1982). Estes estão presentes em vacúolos e são mais comumente

visualizados nas células parenquimáticas da medula, do córtex e floema secundário. Quando cristalizados, são comumente depósitos de oxalato de cálcio, apresentando o formato de prismas, drusas, rafídeos, que podem ser visualizados em fundo escuro, sob luz polarizada (CUTTER, 1986). Esta autora cita que esses cristais podem ser encontrados no interior de células especializadas, denominadas idioblastos, e distribuídos ao acaso.

Na espécie estudada, foi verificada a presença de idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio por toda a lâmina foliar, em concordância com as observações relatadas para as espécies descritas por FREITAS (1985). Adicionalmente, para a espécie em estudo, esses idioblastos também puderam ser observados ao redor de feixes vasculares de menor porte, constituindo uma bainha cristalífera. Segundo CUTTER (1987), de um modo geral, as células parenquimáticas que rodeiam o sistema vascular são morfologicamente diferentes das adjacentes e metabolicamente mais ativas que as demais. ESAU (1990) acrescenta que, em dicotiledôneas, os feixes vasculares de menor porte apresentam-se imersos no mesófilo e os de maior porte, envoltos por tecido fundamental.

Na espécie em questão, os feixes vasculares são colaterais, encontrando-se os de menor porte, envolvidos por bainha parenquimática, e os de maior porte apresentando calotas de fibras perivasculares apostas ao floema.

#### □- Nervura mediana

A nervação é uma das características morfológicas mais evidentes da folha totalmente desenvolvida, constituindo um sistema complexo de feixes vasculares. Na maioria das dicotiledôneas, estes constituem o feixe vascular principal da nervura central, sendo contínuos com o sistema vascular no caule. As nervuras menores são ditas laterais e formam o sistema de nervação reticulado. Este cumpre a função de transporte de água e de solutos dissolvidos na corrente da transpiração e de transporte de produtos da fotossíntese às outras partes da planta. Essa rede de nervuras deve ser capaz de transportar os

materiais para e a partir de todas as células do mesófilo envolvidas na fotossíntese (CUTTER, 1987).

Na superfície da folha, comumente na face abaxial, os tecidos associados aos feixes vasculares maiores formam saliências (costelas), e são frequentemente acompanhados por colênquima em um ou em ambos os lados, subjacentemente à epiderme (ESAU, 1990). Em *P. actinia* pôde ser constatado o seu formato biconvexo, fato coincidente para espécies de *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. edulis* e *P. incarnata*, em trabalho realizado por FREITAS (1985). Contiguamente à epiderme, em ambas as faces, foi detectada uma região de colênquima angular composta por cerca de três a cinco camadas de células, também relatadas pelo mesmo autor para as espécies citadas anteriormente. Essas camadas celulares constituem um tecido mecânico com função de sustentação e são descritas de maneira geral por OLIVEIRA e AKISUE (1998).

Os autores anteriores também mencionam que os feixes vasculares do tipo colateral apresentam o floema disposto perifericamente e o xilema, centripetamente. Os elementos condutores do xilema podem ter disposição radial e estarem separados por uma fileira de células constituindo os raios parenquimáticos. Na espécie estudada, essas características foram evidenciadas, acrescentando o formato praticamente circular dos feixes, que se apresentam em número de quatro e se dispõem segundo um anel, delimitando internamente uma região medular, e a presença de calota de fibras perivasculares aposta ao floema, com função protetora, que também pôde ser identificada em *P. quadrangularis*, de acordo com FREITAS (1985).

Conforme a descrição feita por ESAU (1990), o meristema que origina o xilema e o floema secundários é o câmbio vascular, o qual possui células vacuolizadas que ocorrem em forma inicial fusiforme e inicial radial, podendo caracterizar uma zona cambial, a qual se encontra presente na espécie em questão.

#### □- Pecíolo

Ao segmento foliar que liga o limbo ao caule denomina-se pecíolo (OLIVEIRA; AKISUE, 1998). Nas dicotiledôneas, este apresenta os mesmos

sistemas e, muitas vezes, a mesma disposição encontrados no caule (ESAU, 1990), sendo o seu aspecto muito diversificado (METCALFE; CHALK, 1988). O formato praticamente circular (arredondado) e levemente achatado na face adaxial é o existente em *P. actinia*. Sua epiderme é uniestratificada com células poliédricas e nota-se uma cutícula relativamente espessada e estriada, sendo observados cerca de quatro estratos contínuos de colênquima angular, subjacentes à epiderme e aproximadamente sete feixes vasculares do tipo colateral dispostos em forma de anel. Observação semelhante, em relação à epiderme uniestratificada e ao feixe vascular colateral, foi constatada por FREITAS (1985), em *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. edulis* e *P. incarnata*. Por outro lado, a espécie referente ao atual trabalho não coincide com a descrição do mesmo autor, no que diz respeito à cutícula, para as mesmas espécies citadas.

METCALFE e CHALK (1950) examinaram o pecíolo de uma espécie de *Passiflora*, em secção transversal, o qual apresentou feixes vasculares distintos e podendo ser acompanhados por calotas de fibras perivasculares. Estas também são descritas na espécie em estudo, encontrando-se em diferentes estágios de lignificação.

Com base em OLIVEIRA e AKISUE (1998), as dicotiledôneas podem apresentar endoderme no caule, que corresponde à última camada da região cortical, transformada em bainha amilífera. Essas características são observadas no pecíolo, em *P. actinia*, além de idioblastos com drusas de oxalato de cálcio distribuídos pelo parênquima fundamental.

## **Estudo dos alcalóides terciários de *P. actinia***

O interesse em estudar plantas com atividade sedativa e ansiolítica pode ser justificado pelo fato de que, aproximadamente, 1/8 da população mundial é afetada pela ansiedade e por distúrbios nervosos (DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2001).

O gênero *Passiflora* tem sido tradicionalmente utilizado pelos efeitos sedativo e tranquilizante (REHWALD; MEIER; STICHER, 1994), sendo relatado por DHAWAN; KUMAR; SHARMA (2001) que até o presente momento não está descrito claramente qual constituinte, ou grupo de constituintes, é responsável pelas atividades.

De acordo com a literatura, o gênero é composto, principalmente, por alcalóides e flavonóides. A contribuição deste trabalho para a investigação dos compostos alcaloídicos de *P. actinia*, é em função de que os alcalóides presentes no gênero são pertencentes ao grupo  $\beta$ -carbolina, exemplificado pelos alcalóides harmana, harmina, harmol, harmalol e harmalina. Esses alcalóides foram associados à atividade farmacológica de muitas plantas medicinais que atuam sobre o sistema nervoso central (O'CONNELL; LYNN, 1953; HOCHSTEIN; PARADIES, 1957; SLAYTOR; McFARLANE, 1968; REHWALD; STICHER; MEYER, 1995; PEREIRA; VILEGAS, 2000), acrescentando ainda que, os últimos autores reforçam a necessidade de estudos sobre os constituintes químicos das várias espécies de *Passiflora*.

No presente trabalho a extração dos constituintes alcaloídicos de *P. actinia* foi realizada de acordo com as condições laboratoriais, e segundo a metodologia descrita por alguns autores que isolaram alcalóides de *P. incarnata* (BENNATI, 1967; LUTOMSKI; ADAMSKA; JARUZELSKI, 1968; REHWALD; STICHER; MEYER, 1995). O método extrativo foi realizado a quente em aparelho de soxhlet, até esgotamento da droga, acompanhado por reação com os extratos frente aos reativos gerais de alcalóides - Dragendorff, Mayer e Bertrand.

O extrato alcaloídico bruto foi submetido à técnica clássica de extração ácido/base, a qual permite que os alcalóides presentes na planta, de basicidades

diferentes, sejam reunidos. Esse processo contribuiu também para uma purificação prévia (CORDELL, 1981; EVANS, 1996).

Na seqüência, o extrato resultante foi submetido à cromatografia em coluna empacotada com sílica-gel e alumina atividade II-III, com a utilização de eluentes com polaridades crescentes, sendo constatada melhor separação da fração alcaloídica em coluna de sílica gel.

A detecção dessa fração foi realizada com base no acompanhamento das frações obtidas pelos reativos gerais. A presença dos alcalóides ocorreu quando o eluente utilizado na fase móvel apresentou a concentração de 5% de metanol em clorofórmio.

As frações que continham alcalóides foram reunidas e novamente submetidas à purificação com tratamento ácido/base. O extrato purificado foi incorporado a uma nova coluna de sílica gel, obtendo-se três a quatro frações positivas, frente aos reativos gerais de alcalóides.

Paralelamente, foi realizada uma extração a frio, por percolação da droga, baseada na metodologia descrita por CORDELL (1981) e FREITAS (1985), sendo constatado visualmente, pelos reativos gerais de alcalóides, um rendimento inferior ao processo a quente.

Com o intuito de esclarecer as observações anteriores, foi consultado um trabalho desenvolvido por POINDEXTER e CARPENTER (1962), o qual relatou a presença dos alcalóides harmana e *nor*-harmana em fração de cigarro, após o fumo, sugerindo a formação pirolítica desses alcalóides durante o aquecimento.

A formação de aminas heterocíclicas, que são uma classe de agentes mutagênicos e carcinogênicos, e que podem ser encontradas em determinados alimentos, como carne grelhada e produtos à base de peixe, é descrita em trabalhos realizados por CHIU; CHEN (2000) e SKOG; SOLYAKOV; JÄGERSTAD (2000), os quais citam ser as aminas carbolínicas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) pertencentes a essa classe. No entanto, SUGIMURA e NAGAO (1979) relatam que, os derivados  $\beta$ -carbolínicos harmana e *nor*-harmana não exibem a propriedade mutagênica isoladamente, mas, quando associados a anilina ou toluidina (não mutagênicos), o efeito pode ser evidenciado. Concordantemente, YUKARI et al. (1999) e NORIYASU et al. (2001) abordam esses mesmos aspectos nos trabalhos realizados.

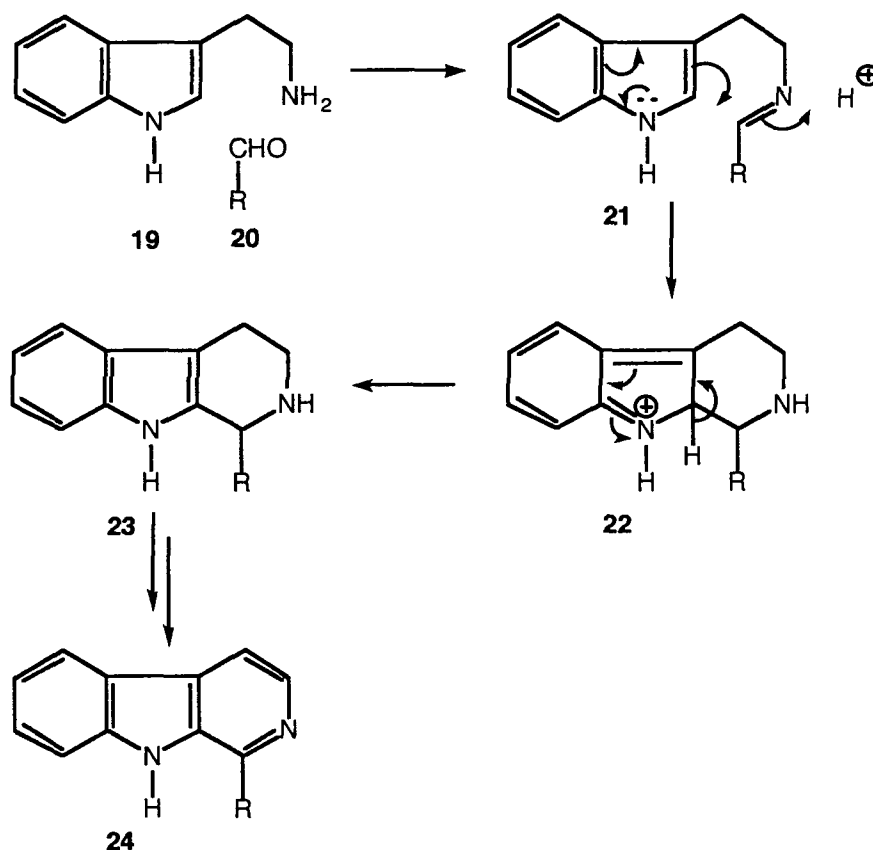
Esses dados e a observação visual que o rendimento de alcalóides era maior quando a extração era feita a quente, levou à necessidade de elaborar reações que pudessem demonstrar, e talvez confirmar, a possível formação dos alcalóides  $\beta$ -carbolinas em espécies de *Passiflora* como artefatos, pelo aquecimento durante o processo extrativo, uma vez que grande parte dos métodos citados na literatura, que isolaram esses alcalóides, foram feitos com aquecimento, o que poderia estar promovendo a síntese dos mesmos.

HARVEY; ROBSON (1938) relatam a síntese de um precursor biológico dos alcalóides da *Harmala*, por meio de reação de condensação a partir do triptofano.

De maneira concordante, SLAYTOR; McFARLANE, 1968; HERBERT; MANN, 1982 citam que os alcalóides do grupo  $\beta$ -carbolina relatados em *Passiflora*, podem ser originados também pela via já citada.

O mecanismo de reação para a formação dos alcalóides do grupo  $\beta$ -carbolina é sugerido por CORDELL, 1981 e por DEWICK, 1998 por meio da condensação de Pictet-Spengler entre a triptamina (**19**) e um aldeído. A triptamina reage com um aldeído (**20**), formando a base de Schiff **21**, que por sua vez, por meio de reação do tipo Mannich, o carbono  $\alpha$  age como um nucleófilo para formar a espécie **22**. A aromaticidade é restaurada por tautomerismo (**23**). Posteriormente, por oxidação forma-se o composto **24**, com esqueleto  $\beta$ -carbolina, conforme o esquema a seguir.

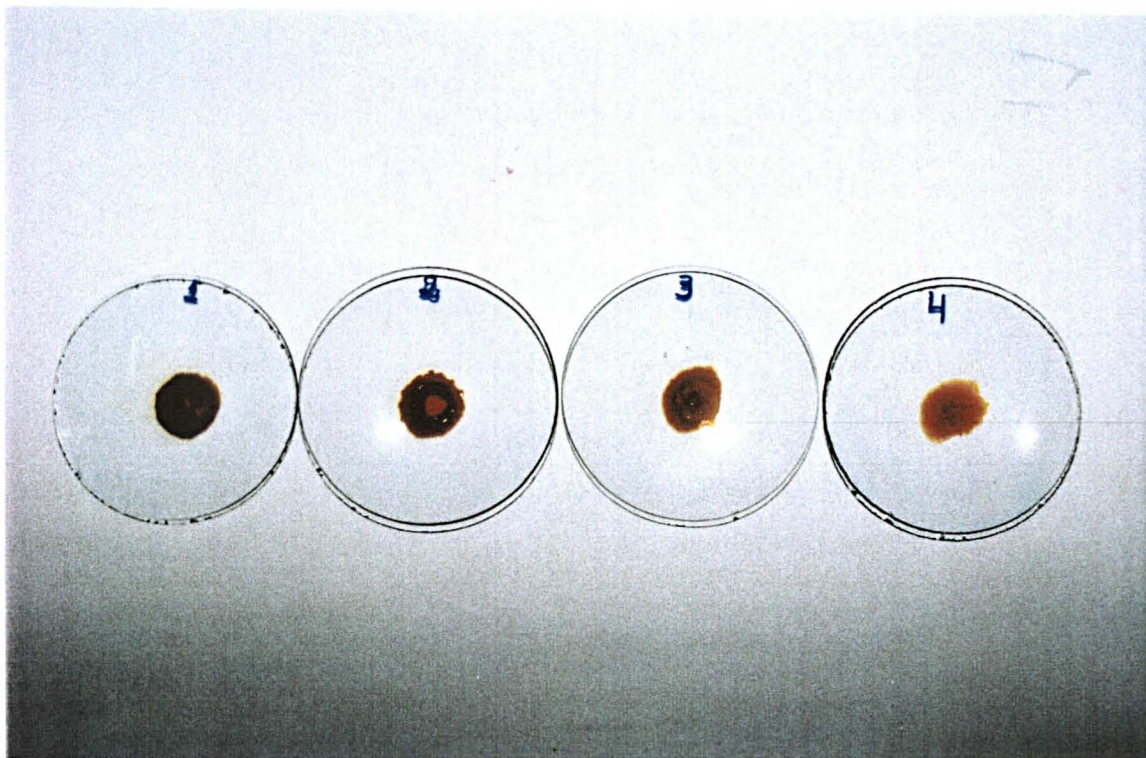




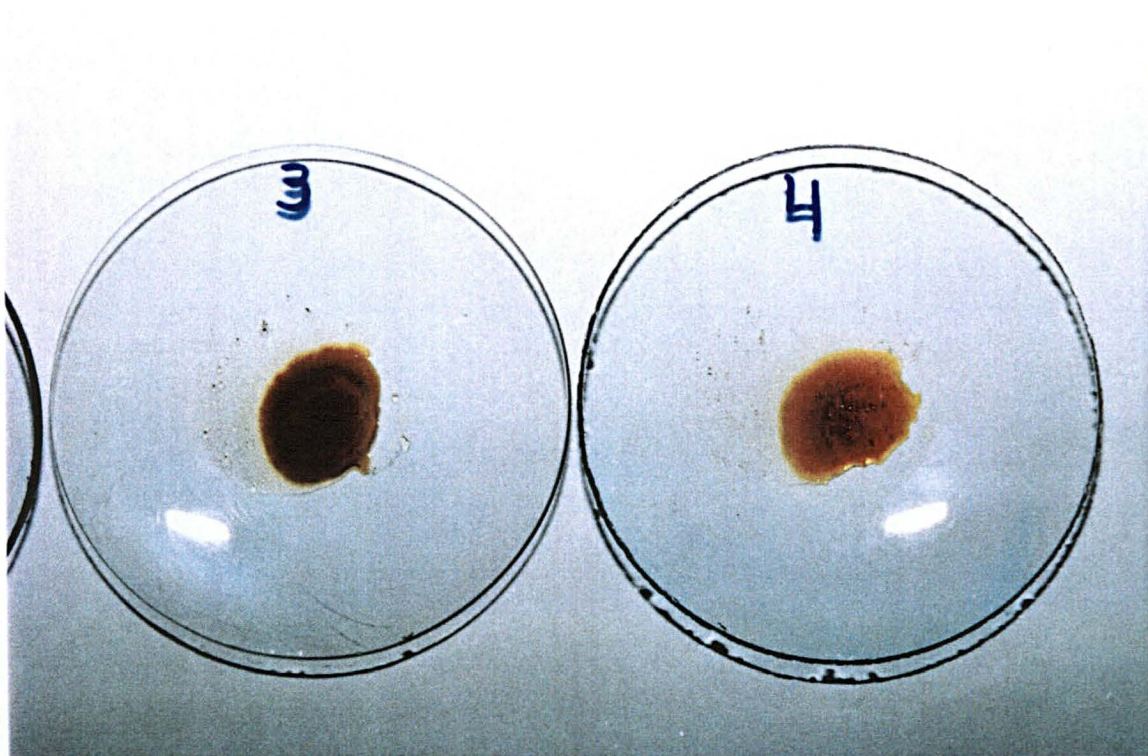
Com relação às reações testadas, foram realizadas triagens por CCD e por reativos gerais de alcalóides, a partir dos extratos obtidos.

Na reação 1 verificou-se o desaparecimento da mancha polar correspondente à triptamina, com formação de substâncias diferentes da citada, de menor polaridade. Verificou-se resultado semelhante ao anterior na reação 2, com menor intensidade da mancha referente à triptamina, podendo ser justificada pelo fato de não ter sido fornecida as condições similares da primeira reação, pois esperava-se que a planta pudesse fornecê-las.

Todas as reações descritas forneceram resultados positivos, frente aos reativos gerais de alcalóides (Figura 32). No entanto, visualmente, pode ser verificada diferença na intensidade das reações. A Figura 33, demonstra com maior detalhe, a menor intensidade de precipitação frente ao reativo de Dragendorff da reação 4, em relação à 3. Ressaltando que, em ambas não havia a adição de triptamina, diferenciando apenas pela ausência ou não do aquecimento.



**Figura 32.** Diferença visual na quantidade de precipitado frente ao reativo de Dragendorff entre as reações 1, 2, 3 e 4.

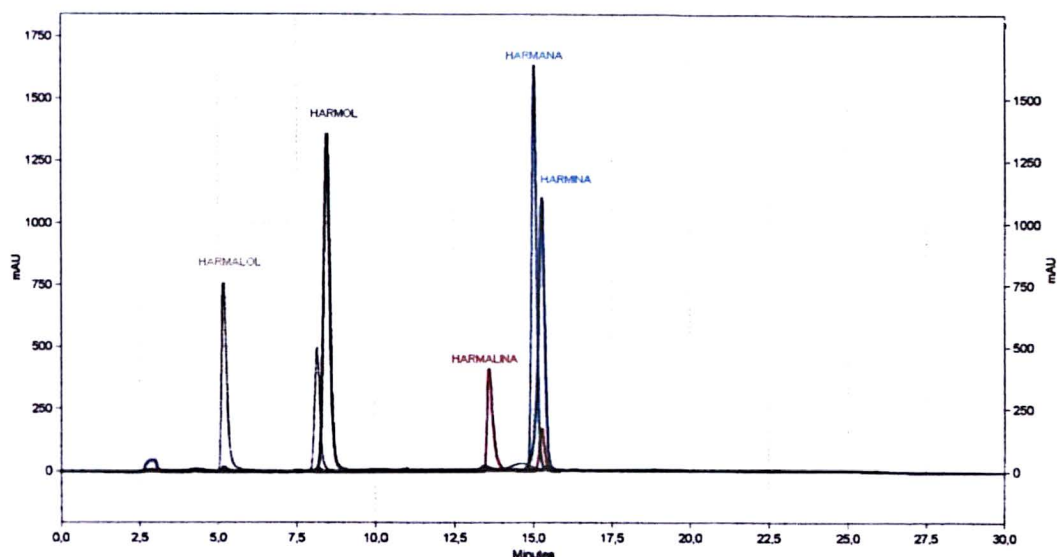


**Figura 33.** Detalhe da diferença visual na quantidade de precipitado frente ao reativo de Dragendorff entre as reações 3 (com aquecimento) e 4 (sem aquecimento).



Com o objetivo de comparação, as frações alcaloídicas, provenientes da extração a quente, juntamente com os padrões comerciais de harmana, harmina, harmol, harmalol e harmalina, foram submetidos a análise por CLAE. A Figura 34 demonstra o tempo de retenção apresentado pelos padrões.

Resultante da extração a quente, obtida por soxhlet, por meio de eluente composto por uma mistura de 5% de metanol em clorofórmio, obteve-se a fração com melhor definição no cromatograma (48-79), apresentando uma substância com o tempo de retenção de 14,08min, próximo ao sinal apresentado pelo padrão de harmana em 15,01min (Figura 35).



**Figura 34.** Tempo de retenção em CLAE apresentado pelos padrões de alcalóides  $\beta$ -carbolínicos.

Em seguida, foi realizada uma varredura em ultravioleta dos sinais possíveis de serem alcalóides do tipo harmana. Os espectros de ultravioleta apresentados pelo padrão harmana e pelo composto encontrado no extrato foram avaliados mostrando serem coincidentes nos comprimentos de onda de 212nm, 234nm, 249nm e 287nm (Figura 35).

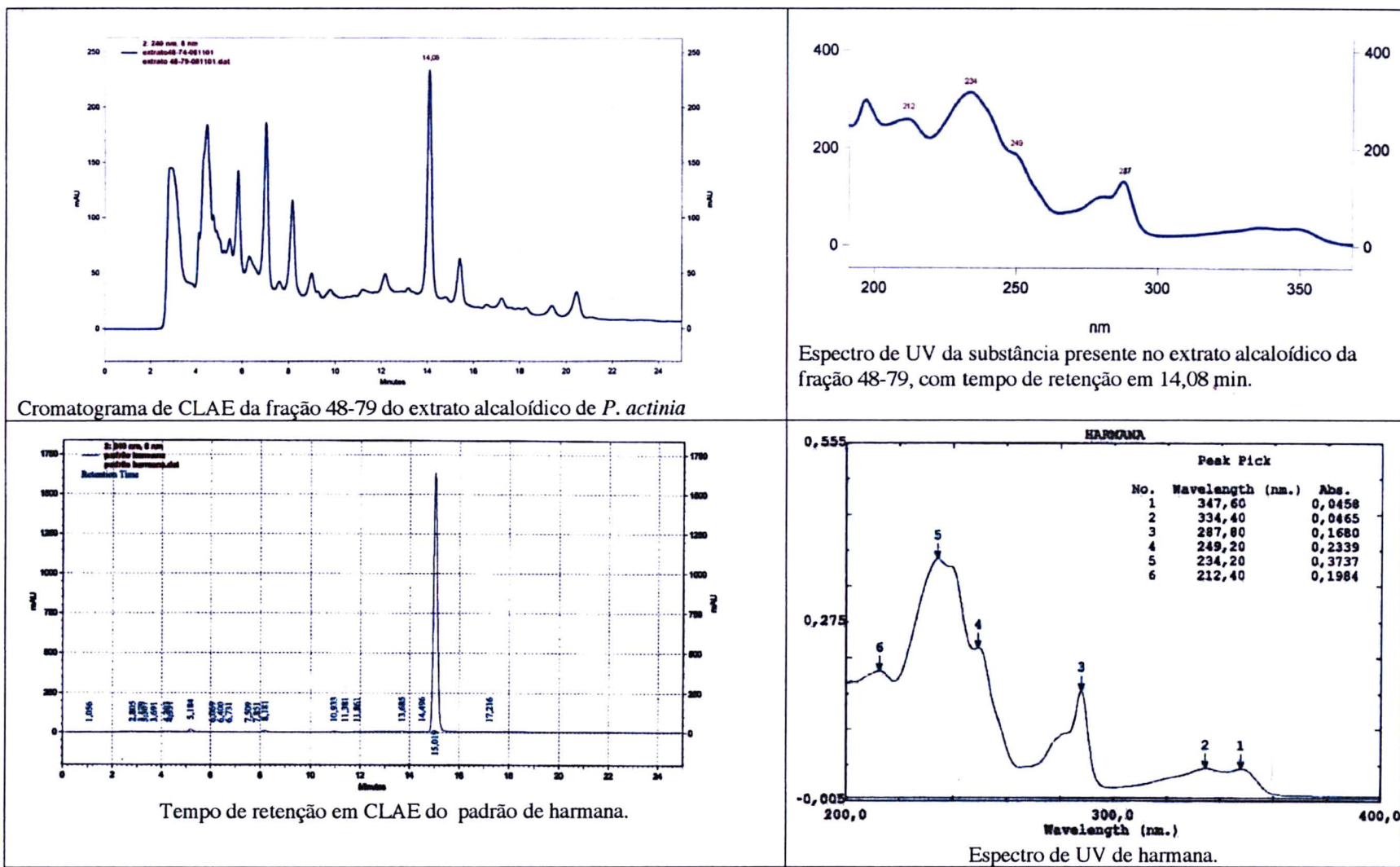
Em função do resultado acima obtido, foi realizada uma nova análise do extrato alcaloídico (fração 48-79), por co-adição do padrão de harmana. Um aumento da altura do pico, referente ao composto investigado, no tempo de retenção apresentado pelo padrão era esperado, no entanto, observou-se diferença nesse tempo, de cerca de 1min, entre ambas substâncias, sugerindo

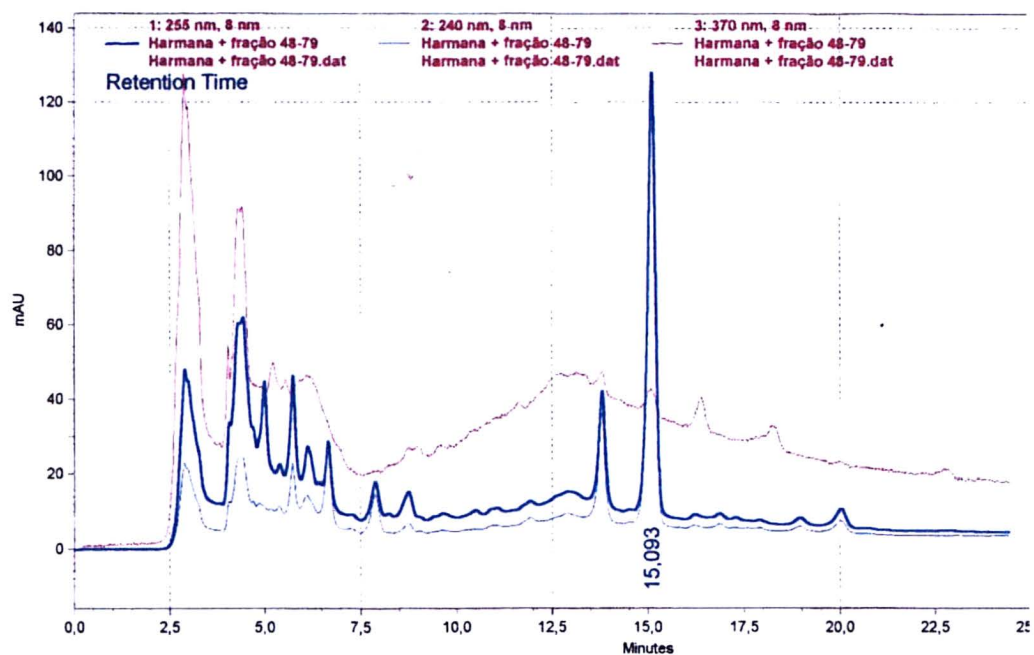
que o composto investigado com tempo de retenção de 14,08min, não tratava-se do alcalóide harmana.

Por outro lado, um pequeno sinal no cromatograma, com tempo de retenção em 15,09min foi observado, sendo o espectro de ultravioleta semelhante ao padrão harmana, sugerindo a presença desse alcalóide em pequena quantidade. Ensaio com co-adição do mesmo padrão e da fração alcaloídica mostrou tratar-se do mesmo composto (Figura 36), confirmado pelo espectro no ultravioleta. Sugere-se que a espécie de *P. actinia*, possui alcalóides do tipo *harmala* em maior quantidade quando extraídos a quente, porém, foi possível apenas a detecção do sinal referente ao alcalóide harmana.

A presença desses alcalóides como artefato em diversas espécies de plantas é citado por TSUCHIYA; SHIMIZU; IINUMA (1999). Os autores sugerem uma nova metodologia por CLAE capaz de eliminar tal interferência na determinação real dos alcalóides presentes nas espécies estudadas.

**Figura 35.** Comparação entre os cromatogramas em CLAE e espectro de UV do padrão de harmana e o composto com tempo de retenção em 14,08 min.





**Figura 36.** Cromatograma em CLAE co-adição do padrão de harmana com a fração de alcalóides 48-79.

## Desenvolvimento da formulação

No decorrer da avaliação dos resultados dos ensaios realizados para o controle farmacognóstico da droga, referente à espécie *P. alata*, foi possível confirmar a identidade e o estado de pureza da droga utilizada, pois, não foram observadas contaminações ou adulterações no material.

O teor de cinzas totais e de cinzas insolúveis também auxiliaram na avaliação da qualidade da droga, referente aos processos de coleta utilizados. Os resultados dessas determinações encontram-se na Tabela 1. Especificamente, para a espécie utilizada não há citações sobre os parâmetros que foram avaliados, tendo sido utilizadas especificações estabelecidas para *P. incarnata*. Observa-se na BHP (1983) o valor de 10% como limite máximo de cinzas totais, para a espécie relatada anteriormente. Durante a determinação realizada com *P. alata* observou-se um valor médio de cinzas totais de 8,72%, o que, comparado aos limites para *P. incarnata*, sugere que possa ser aceita como dentro desse parâmetro e, futuramente, contribuir para uma padronização da análise. Valores elevados de cinzas insolúveis em ácidos podem indicar contaminação por areia, pois determinam a presença de sílica e de constituintes silicosos na droga. O valor estabelecido para este parâmetro é o máximo de 3%, (BHP, 1983), podendo ser confirmado, através do resultado apresentado de 1,52%, para *P. alata*, que a droga encontrava-se dentro dos limites estabelecidos. Apesar de não haver literatura específica para este aspecto, os ensaios realizados em triplicata, podem contribuir no estabelecimento de parâmetros para a espécie em questão.

Por apresentarem método de quantificação de fácil execução, os flavonóides foram escolhidos como marcadores químicos, e determinados na droga através de metodologia citada pela PHARMACOPOEA (1995), para *P. incarnata*, a qual utiliza reação de precipitação dos flavonóides totais através de solução de cloreto de alumínio, com a formação de um gel que adsorve os

mesmos. Esse precipitado é dissolvido em ácido acético, adquirindo uma coloração própria que permite o doseamento (ZUANAZZI, 1999).

O valor médio do teor de flavonóides na droga analisada foi de 0,38%. Embora o resultado esteja condizente com o valor mínimo de 0,30%, relatado pela BHP (1983) para *P. incarnata*. PETRY et al. (1998) cita que esse método é geral e preconizado para espécies vegetais ricas em flavonóides, como *Camomila recutita*, *Crataegus* sp., além de *P. incarnata*, demonstrando várias possibilidades de erro analítico, devido ao fato do método ter sido desenvolvido, de forma específica, para a análise da rutina e de flavonóides O-glicosilados, mas não para flavonóides C-glicosilados que podem resistir à hidrólise ácida, conforme os encontrados no gênero *Passiflora*.

O produto fitoterápico intermediário, a tintura de maracujá, foi elaborado tecnicamente de acordo com as especificações da FARM. BRAS. II (1959) para tinturas em geral, pelo processo P, que consiste da maceração prévia e posterior percolação. A Farmacopéia Brasileira em sua 1ª edição (SILVA, 1929) cita a necessidade de realizar uma tamisação do macerado, porém, nesta etapa torna-se dispensável, procedendo a uniformização do mesmo por meio de umedecimento pelo líquido extrator, composto por uma solução hidroetanólica a 45° GL. A especificação utilizada refere-se à *P. incarnata*, (BHP, 1983; NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996), pois há escassez de dados sobre a espécie *P. alata*. De acordo com a técnica referida, para cada 100g de droga utilizou-se o líquido extrator, suficientes para obter um volume final de 800ml de percolato, caracterizando a proporção 1:8 (droga/líquido extrator). Foi monitorada, qualitativamente, a presença de flavonóides na tintura por meio de reação de caracterização – Reação de Shinoda, que consiste na adição de fragmentos de magnésio à solução alcoólica ácida da substância a avaliar. Ocorre a redução dos derivados flavônicos de cor amarela, os quais adquirem coloração avermelhada após reação (ZUANAZZI, 1999).

Para a realização do controle de qualidade de tinturas (Tabela 2) efetuou-se, inicialmente, a determinação da densidade a 20°C, que segundo PRISTA; ALVES; MORGADO (1990), se situa entre os valores de 0,8700g/ml a 0,9800g/ml. Este dado foi confirmado em *P. alata* devido aos resultados médios obtidos de 0,9601g/ml.



A determinação do resíduo seco é empregado com muita utilidade para a avaliação de tinturas, sendo os valores apresentados para cada tintura considerados específicos. Quando se observa um resíduo seco inferior ao normal, pode-se pressupor a ocorrência de erros de diluição de tinturas, (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990).

Na análise em questão, o valor médio obtido para *P. alata* foi de 2,45%, sendo concordante com os valores habituais de 1 a 6%, citados pelos mesmos autores, de modo inespecífico. Acrescentam ainda que, excluem-se a essa padronização as tinturas balsâmicas ou resinosas, as quais originam maior porcentagem de resíduo seco.

Outro fator avaliado foi o título etanólico da tintura, que apresentou o resultado médio de 36°GL, apesar do processo extrativo ter partido de solução hidroetanólica a 45°GL, e NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON (1996). Sob esse aspecto, ressalta-se que a BHP (1983) especifica álcool 45% mas, para efeito de padronização optou-se pelo preparo desse líquido extrator, de acordo com a metodologia da alcoometria da Farmacopéia Brasileira 2ª edição (FARM. BRAS. II, 1959), obtendo-se desse modo um álcool a 45° GL, graduado em volume, a 15°C, determinado em alcoômetro Gay-Lussac. Essa padronização foi também utilizada para a determinação do título etanólico do elixir. Em relação à diminuição da concentração hidroetanólica, esta pode ser perfeitamente justificável na prática, pois a tintura não foi elaborada em recipiente hermeticamente fechado, ocorrendo perda parcial do álcool durante o processo.

As tinturas possuem inúmeros constituintes e apresentam excelente conservação como vantagens. Por outro lado, o sabor não é agradável, podendo ser ácido, adstringente ou amargo, resultantes da parte vegetal utilizada e do teor alcoólico elevado. Esta última característica, de acordo com PRISTA; ALVES; MORGADO (1990) e JATO (2000), faz com que a maioria das tinturas não sejam adequadas para crianças ou para dependentes de álcool. As determinações realizadas, associadas às características organolépticas observadas, contribuíram para a determinação da identidade da tintura de *P. alata*. Não foi possível a realização do doseamento de flavonóides, pela técnica anteriormente citada, na formulação intermediária, pois a metodologia não foi efetiva para soluções hidroalcoólicas. Essa dificuldade no doseamento de tinturas é abordada

por PRISTA; ALVES; MORGADO (1990), que apontam para a possibilidade de interferência de fatores como a quantidade elevada de preparações necessárias ao ensaio, ou devido a outras substâncias, que não os princípios ativos.

Na sequência, foi realizada a avaliação por CLAE do perfil cromatográfico da tintura de *P. alata*, previamente à incorporação na formulação final (Figura 37) para, posteriormente, ser comparada ao cromatograma apresentado pelo elixir (Figura 38).

Na formulação proposta, foi utilizada a tintura de maracujá incorporada ao xarope de açúcar invertido, determinando uma solução hidroalcoólica açucarada. Empregou-se o propilenoglicol com a finalidade de melhorar a solubilidade e evitar precipitação dos componentes, através do aumento da viscosidade, auxiliando deste modo a estabilidade da formulação, conforme relatado por PRISTA; ALVES; MORGADO (1990), ao se referirem aos elixires em geral. Nesse aspecto deve-se atentar para os cuidados durante a escolha do agente solubilizante, sendo recomendado, além do propilenoglicol e álcool, componentes do elixir, polissorbatos 40 e 80 (DEVI; RAO, 1995). Segundo WAX (1995), não se deve optar pelo etilenoglicol, apesar de suas propriedades físicas se assemelharem ao propilenoglicol, devido aos problemas de intoxicação ocorridos em 1937, causado pelo elixir de sulfanilamida, sendo proibido desde então pela *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos da América.

O elixir viabiliza manter em dissolução, tanto substâncias solúveis em água, quanto substâncias solúveis em álcool, concomitantemente, além de apresentar boa palatabilidade, devido à presença de agentes edulcorantes e flavorizantes, em sua composição (JATO, 2000). Desse modo, os elixires tornam-se formulações preferenciais em comparação às soluções e suspensões, de acordo com observações realizadas por BURLESON et al. (1978), em análises sensoriais com soluções, suspensões e elixires de teofilina.

A essência de limão foi adicionada com o intuito de atuar como corretor de sabor, sendo os cítricos mais indicados (ALLEN JUNIOR, 1997; JATO, 2000).

Apesar de JATO (2000) citar que esse tipo de formulação dificilmente se contamina por agentes microbianos, devido ao teor alcoólico, foi adicionado à fórmula proposta metilparabeno (0,2% m/v) pois, ANSEL; POPOVICH; ALLEN (2000), relatam, de maneira geral, que preparações hidroalcoólicas necessitariam

de apresentar concentração alcoólica de 15% a 18%, em meios ácidos e alcalinos, respectivamente, para evitar o crescimento microbiano. Além dessa observação, PRISTA; ALVES; MORGADO (1990) citam que processos fermentativos relacionados a enzimas resistentes ao álcool podem ocorrer nas tinturas, podendo ser fenômenos ocasionados pelo envelhecimento ou pelo mau acondicionamento das mesmas, resultando em alterações de suas propriedades iniciais. Desta maneira, o metil 4-hidroxibenzoato (metilparabeno) foi escolhido para ser incorporado ao elixir, pois apresenta proteção efetiva em variações amplas de pH (4-8), além de largo espectro de atividade antimicrobiana, com maior eficácia contra fungos e leveduras. A adição de 2% a 5% de propilenoglicol às formulações, a eficácia antimicrobiana pode ser melhorada (WADE; WELLER, 1994). O mesmo autor estabelece a concentração de 0,015% a 0,2% de metilparabeno em soluções orais.

De maneira geral, formulações fitoterápicas são meios ricos para crescimento de microorganismos, e segundo BAIRD (1977), o grau de risco de contaminação microbiana muitas vezes é afetado pelo estado físico do produto. Dessa maneira, as soluções e dispersões aquosas, emulsões O/A e surfactantes não iônicos são os mais suscetíveis, reforçando a necessidade de adição de conservantes nessas formulações.

Apesar da adição do conservante à formulação é fator imprescindível, para a elaboração de produtos, respeitar-se as regras das boas práticas de fabricação (BPF) durante o processamento, que são indispensáveis para a obtenção de produtos livres de patógenos, acrescentando a necessidade de monitorar essas etapas por meio de controles físicos, químicos e microbiológicos e efetuar esses mesmos controles após a elaboração do produto, e nas etapas posteriores para a determinação do prazo de validade.

Desse modo, após a elaboração da formulação foram realizados os ensaios para a avaliação da qualidade do elixir (Tabela 3), resultando a densidade em valor médio de 1,2333 g/ml, apesar de não haver especificações sobre a formulação em questão, em comparação ao produto intermediário – a tintura de maracujá, é possível justificar o aumento ser devido aos excipientes incorporados, os quais têm a finalidade de aumentar a viscosidade e melhorar a estabilidade.

O título etanólico da formulação apresentou valor de 11,72° GL, em média, conforme citado por ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR (2000), os quais relatam que os elixires não devem exceder a concentração hidroalcoólica de 20%, embora a F. BRAS. IV (1988) relate que o teor alcoólico dos elixires, em geral, se apresentem na faixa de 20% a 50%. Esse valor obtido também reforça a necessidade de adição de conservantes.

Considerando-se as observações relatadas por BROWN et al. (1982), que verificaram intoxicações causadas por elixires de teofilina preparadas com concentrações etanólicas em torno de 20° GL, constata-se que os teores especificados pela F. BRAS. IV (1988) são elevados. Para tanto, seria conveniente buscar a menor proporção de etanol que possa proporcionar tanto solubilidade, quanto estabilidade da formulação, visto que, observações relatadas por SLIGO; CHARLES; RAVENSCROFT (1982), em preparações de elixires de teofilina com e sem etanol, não constatarem a ocorrência de problemas de estabilidade e de biodisponibilidade.

A formulação final foi submetida a testes de estabilidade física, química e microbiológica, as quais são reconhecidas pela indústria farmacêutica e consideradas imprescindíveis, pois o empirismo verificado em tempos passados foi substituído por princípios científicos para avaliação da estabilidade, baseando-se em princípios físicos e químicos que auxiliam na caracterização do envelhecimento de um medicamento (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Para a avaliação da estabilidade física, foi proposta a análise dos parâmetros referentes a cor, odor, sabor, aspecto, viscosidade e pH, iniciando-se logo após a elaboração (Tabela 4 e 5). Foi estabelecida suas características organolépticas iniciais, as quais foram enumeradas como "00" (Tabela 5). A formulação apresentou cor amarelo claro, sabor alcoólico adocicado e aspecto límpido e viscoso, sendo determinada como formulação sem alterações. Esses mesmos parâmetros físicos continuaram sendo avaliados sob condições de temperatura de 50°C e de 40°C, semanalmente, caracterizando o teste acelerado de estabilidade, que de acordo com ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR (2000), tem a finalidade de prever e determinar a curto prazo instabilidade na formulação.

Com base nos cromatogramas (Figuras 37 e 38) referentes à tintura e ao elixir, em seguida ao preparo, pode-se notar a similaridade entre algumas

regiões, comuns a ambas formulações, colaborando para a comprovação da qualidade deste, isto é, para a detecção da tintura na formulação final. Para essa avaliação, foram determinados cinco sinais nos cromatogramas, referentes à tintura e ao elixir, com tempos de retenção para a tintura, em 19,91min; 20,65min; 21,91min; 25,96min; 31,90min e para o elixir, 19,16min; 19,83min; 20,99min; 24,97min; 31,07min, comuns a ambas formulações, desempenhando o papel de marcadores para o acompanhamento da estabilidade química da formulação.

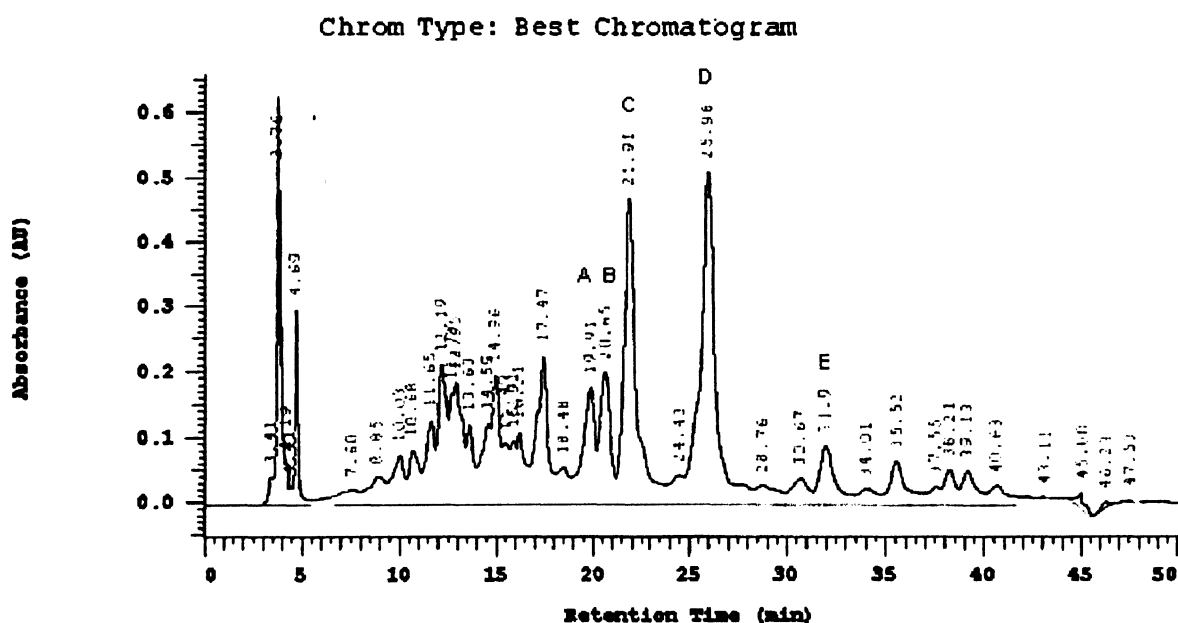
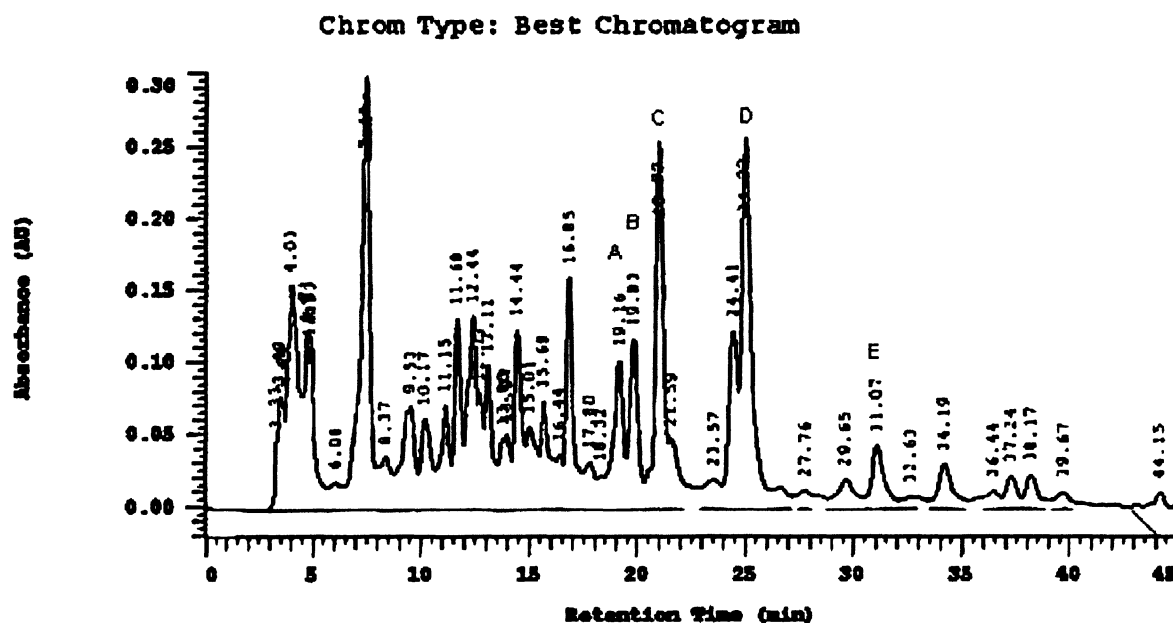


Figura 37. Perfil cromatográfico da tintura de maracujá, seguido ao preparo





**Figura 38.** Perfil cromatográfico do elixir de maracujá, seguido ao preparo

Durante a avaliação das características organolépticas do elixir de maracujá na primeira semana, em temperaturas de 50°C e de 40°C, foram observadas alterações significativas em ambas amostras, caracterizando sua instabilidade (Tabela 6 e 7). Foram atribuídos valores condizentes com as alterações organolépticas observadas, sendo as alterações referentes à cor amarelo clara, que se alterou para castanha, e seu aspecto límpido, o qual se tornou ligeiramente turvo. Apesar da instabilidade dos caracteres organolépticos, pôde ser observado que não houve alterações relevantes de pH e de viscosidade (Figuras 30 e 31).

Com relação à estabilidade microbiológica, foram realizadas análises no tempo zero e após oito meses de estocagem a temperatura ambiente (Tabela 9 - p. 56), não apresentando contaminantes em ambas análises. É necessário lembrar que as amostras avaliadas em seguida ao preparo, sofreram um processo de neutralização do conservante, para possibilitar a verificação de possível contaminação prévia.

SINGER (1987) relata que o neutralizante não deve ter efeito inibitório sobre o crescimento microbiano, pois, no caso de ocorrer uma neutralização lenta, poderia permitir um efeito biocida, por parte do neutralizante, interferindo na

quantificação microbiológica. Por outro lado, PALMIERI (1983) cita que a lecitina e o polissorbato utilizados como neutralizante, são adequados e eficazes contra os vários tipos de conservantes, inclusive contra os parabenos, sendo estes os escolhidos.

A qualidade microbiana de formulações farmacêuticas é uma dentre as várias exigências para determinar a segurança do produto acabado, pois, podem constituir risco à saúde do consumidor, principalmente, tratando-se de microorganismos patogênicos.

Quando se detecta a instabilidade de formulações, quer sejam por qualquer alteração, são dados que levam à reformulação (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2000).

Porém, LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG (2001) citam a dificuldade de estudar a estabilidade de um ou mais fármacos numa mesma forma farmacêutica líquida, abordando a possibilidade de ocorrerem interações entre as substâncias devido aos vários constituintes presentes, tendo-se ainda que levar em consideração as diferentes características de degradação que cada substância pode possuir.

Tendo como base os últimos autores, e considerando a variedade de substâncias presentes nas formulações fitoterápicas, foi proposto para o presente trabalho, a continuação da avaliação da estabilidade física do elixir de maracujá, em temperatura ambiente, pois o mesmo possui em sua constituição a tintura de maracujá, sendo um produto fitoterápico que, quando exposto a temperaturas elevadas pode provocar interação entre os vários constituintes existentes, levando à instabilidade da formulação. Não se pode deixar de relatar que os protocolos existentes para a análise da estabilidade de formulações foram estabelecidos para a avaliação de medicamentos sintéticos, não existindo metodologias específicas para fitoterápicos, o que leva à discussão da validade dessa adaptação.

Em relação às determinações de pH, de acordo com ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR (2000), é um dos fatores importantes no processo de formulação, sendo crítico para formas farmacêuticas líquidas, onde alterações de pH conduzem, em alguns casos, à instabilidade física, química e

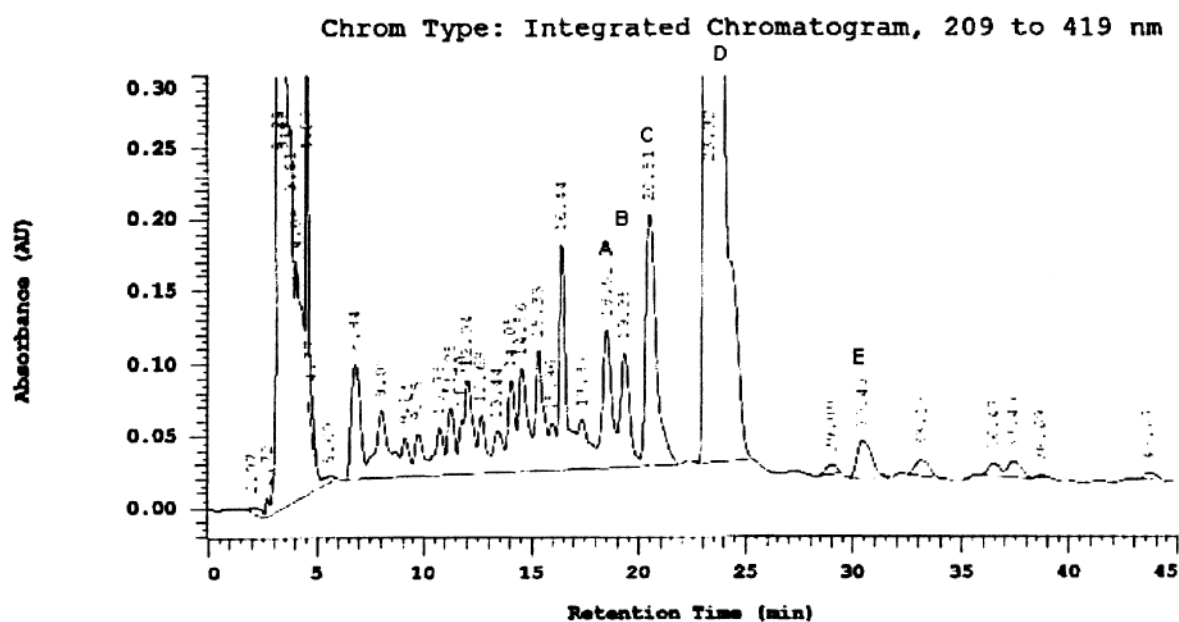
microbiológica. No presente trabalho, não se constatou variações relevantes de pH, que permaneceram entre 5,80 a 6,47 (Tabela 8 e Figura 31).

Com referência à verificação da viscosidade das formulações mantidas à temperatura ambiente, pôde-se verificar, de maneira inicial, que os valores médios de viscosidade não apresentaram alterações relevantes no primeiro mês. Um aumento do valor pôde ser percebido no segundo e terceiro mês, sob as mesmas condições, podendo ser justificado pelo fato da estocagem das amostras terem sido feitas sem controle de temperatura, podendo ter interferido na estabilidade da formulação, pois estas amostras analisadas eram referentes aos meses de dezembro e de janeiro, quando a temperatura ambiente encontrava-se elevada, por esta razão foi dada continuidade a análise do mês subsequente, quando foi possível observar o retorno da viscosidade aos valores iniciais, justificando a possível interferência da temperatura na determinação anterior.

Ainda em relação à viscosidade, o elixir de maracujá comportou-se como um líquido newtoniano, durante todas as etapas do ensaio, verificado pelos valores similares de viscosidade em leituras, tanto em velocidade de 100 rpm, quanto 60 rpm (Figura 30) o que corrobora com PENSO (1992), o qual relata a lei de atrito de Newton aplica-se para líquidos de composição simples ou de baixa viscosidade, o que independe, nesses casos, da velocidade e da força de cisalhamento, aplicadas sobre esses.

Porém, na avaliação do terceiro mês foram verificadas alterações leves dos caracteres organolépticos do elixir, determinando um aspecto ligeiramente turvo com início de formação de alguns grumos não sedimentados, características essas que se mantiveram nos meses seguintes.

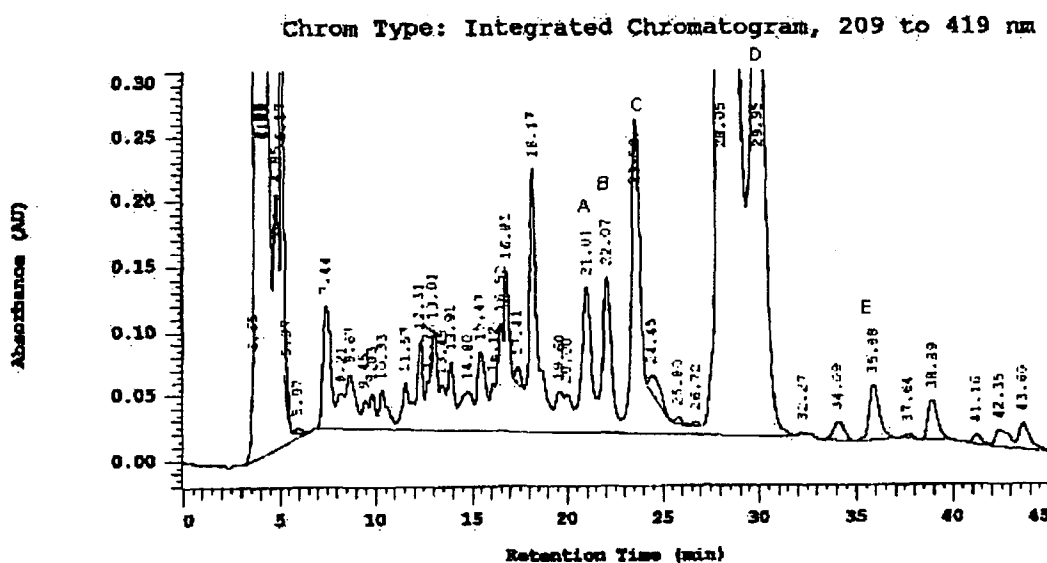
No quarto mês de avaliação percebeu-se alterações no perfil cromatográfico demonstrando a presença de substâncias não detectadas inicialmente, pois podem ser observada alterações referentes a alturas dos picos, que sugerem mudanças de concentração das substâncias, enquanto que, outras permaneceram praticamente inalteradas, por exemplo a substância E com tempo de retenção 30,43min (Figura 39). É importante ressaltar que a respeito dos caracteres organolépticos, houve uma leve alteração de paladar da formulação.



**Figura 39.** Perfil cromatográfico do elixir de maracujá, após quatro meses a temperatura ambiente.

No sétimo mês de avaliação houve intensificação das alterações organolépticas, somadas então, a um aumento da viscosidade, mas com manutenção do comportamento newtoniano, a qual, nessa ocasião, não sofreu interferência da temperatura, se manteve satisfatória. Houve acúmulo de alterações físicas e químicas, que culminaram, ao final de oito meses, com mudanças intensas de coloração, a qual tornou-se castanha-escura, e com a presença de inúmeros grumos não sedimentados, que após agitação redispersaram deixando o meio turvo.

Pode-se observar na Figura 40, uma grande modificação do perfil cromatográfico, após oito meses, quando nota-se, principalmente, um acréscimo do constituinte D, com tempo de retenção de 35,98min.



**Figura 40** Perfil cromatográfico do elixir de maracujá, após oitavo mês à temperatura ambiente.

PRISTA; ALVES; MORGADO (1990) relatam alterações comuns sofridas pelas tinturas, como precipitações, oxidações, hidrólises e até reações com componentes cedidos pelo vidro do recipiente. Apesar do mesmo autor citar que precipitações podem ser desencadeadas pelo frio, o qual favorece a deposição, pela diminuição do coeficiente de solubilidade, no trabalho realizado foi verificada a formação de grumos, em temperaturas de 40 e 50° C .

Reações de oxidação podem ter ocorrido, pois as flavonas e muitos alcalóides podem sofrer essa transformação (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990), porém, de acordo com JATO (2000) há a possibilidade da incorporação de agentes antioxidantes para melhorar a estabilidade de elixir. Sob esse aspecto pode-se sugerir a incorporação de antioxidantes vegetais, solúveis em água, como o ácido elágico – isolado de frutos, legumes, os glucosídeos de lignina – presentes nas sementes de gergelim (OSAWA, 1995).

Flavonosídeos podem ter sofrido hidrólise, de acordo com PRISTA; ALVES; MORGADO (1990), sendo também relatado pelo mesmo autor o estudo realizado por Ramos Morgado, onde foi observada uma destruição superior a



10% de apigenina na tintura de camomila. Fato interessante, pois os flavonóides presentes em *Passiflora* são derivados da apigenina, podendo ter contribuído para a instabilidade.

A desestabilização do elixir de maracujá pode ter ocorrido devido a vários fatores, em grande parte devido à variação da temperatura ambiente, em alguns meses, no decorrer do ensaio, apesar de constar na F. BRAS. IV (1988) que, temperatura ambiente é aquela que se mantém em torno de 15°C a 30°C, em determinado local. Um controle mais rigoroso de temperatura com a fixação de um valor intermediário entre essas temperaturas, com controle de umidade, poderia ser proposto para os ensaios com fitoterápicos.

JATO (2000) cita a necessidade de manter uma concentração alcoólica no elixir, similar à utilizada na tintura que se deseja incorporar, para que não haja uma redução do conteúdo alcoólico, o que poderia ocasionar precipitações de substâncias pouco solúveis em água.

Outro fator interferente, pode ter sido a incorporação da tintura em outra forma farmacêutica – elixir, pois de acordo com PRISTA; ALVES; MORGADO (1990), foi verificada associações de tinturas no emprego de xaropes, que desencadearam incompatibilidades, traduzidas freqüentemente, pela formação de precipitados ou de turvações. Segundo os mesmos autores, o precipitado pode estar relacionado simplesmente, com a diluição das tinturas em água, ou pela reação de taninos com alcalóides. As observações anteriores podem ter sido pertinentes à formulação em análise, visto que o elixir é uma formulação intermediária ao xarope e à tintura. Para atenuar ou eliminar tais incompatibilidades desencadeadas pelas tinturas, pode-se baixar o pH do meio através de ácido cítrico, tartárico, ou ainda, elevando a viscosidade pela adição de glicerina, associado ao propilenoglicol presente na formulação. A utilização de tensoativos (O/A), como os polissorbato 40 e 80 (0,5% a 2%) também são referidos por PRISTA; ALVES; MORGADO (1990).

O conjunto de resultados obtidos no acompanhamento da formulação sugerem a instabilidade da forma farmacêutica proposta – elixir de maracujá.

É necessário discutir e tentar contornar tais problemas constatados no elixir de maracujá. Poderia ser sugerido a reformulação com cuidados rígidos sobre a temperatura ambiente de estocagem.

A tintura de maracujá poderia ser também submetida aos testes de estabilidade, visto que, em grande parte pôde ser responsável pelo desencadeamento de reações de desestabilização.

Ainda deve ser levado em consideração a necessidade de desenvolver técnicas mais apropriadas para avaliar a estabilidade de fitoterápicos, o que seria ideal, de acordo com AHN; KIM; KIM (1998) e LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG (2001), avaliar o perfil de degradação para cada substância da mistura, sendo no entanto, praticamente impossível, em função do grande número de compostos existentes na tintura, conforme pode ser observado na Figura 37.

Permanecendo a dificuldade em estabilizar a forma farmacêutica líquida – elixir, pode-se sugerir, para estudos futuros, o desenvolvimento farmacotécnico de extratos secos nebulizados, de acordo com metodologia desenvolvida por SOUZA (1997), para *P. edulis*, ou elaboração de "elixir seco" (KIM; YOON; KONG, 1995)

Vale ressaltar, que o presente trabalho teve o intuito de desenvolver um estudo preliminar para determinar alternativas farmacotécnicas para a incorporação do substância responsável pelo efeito sedativo, apresentado pelo maracujá, para isso, foram relatadas as dificuldades encontradas para tal desenvolvimento. Uma continuidade dos estudos, seria oportuna, com aprofundamento das avaliações químicas, a fim de saber quais as reações que contribuíram para a formação dos grumos, para as alterações químicas, apresentadas nos cromatogramas ao longo dos meses de acompanhamento, e principalmente, quais os caminhos possíveis que deverão ser tomados para contornar tais problemas.

## CONCLUSÃO

---

### Estudo morfo-anatômico

O estudo morfo-anatômico em *P. actinia* permitiu concluir que externamente, a folha da espécie em questão é ova l, sendo a margem lisa, a base arredondada e o limbo inteiro. A lâmina foliar apresentou cutícula relativamente delgada e levemente estriada, em ambas as faces, com cera epicuticular em formato de escamas. As células epidérmicas da face abaxial são mais sinuosas em comparação com as células da face adaxial, além de possuírem papilas proeminentes. Observou-se a presença de estômatos somente na face abaxial da folha, determinando-a como hipoestomática. O mesófilo observado possui organização dorsiventral ou bifacial. A nervura mediana foi caracterizada como biconvexa, possuindo uma epiderme uniestratificada, com a presença de região colenquimática, contiguamente à epiderme. As células que compõem o pecíolo demonstraram o formato praticamente arredondado, sendo as células de formato poligonal. Os feixes vasculares são do tipo colateral, dispostos em forma anelar. Idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio foram observados ao longo do parênquima fundamental.

## **Estudo dos alcalóides terciários de *P. actinia***

Conforme a metodologia realizada para a extração e identificação de compostos alcaloídicos de *P. actinia* foi possível determinar a presença do alcalóide derivado do grupo  $\beta$ -carbolina – harmana, além de ser verificada, visualmente, a formação desses alcalóides, em maior quantidade, quando extraídos pelo aquecimento. Novas pesquisas sobre os alcalóides e os mecanismos de formação destes na planta devem ser realizadas. Sugere-se para trabalhos futuros a reavaliação das condições na condensação de Pictet-Spengler com a utilização de variações no pH, temperatura e solventes.

O estudo da atividade sedativa da espécie em questão também pode ser objetivo de trabalhos futuros, baseado no fato de pertencer a um grupo que não se obteve com clareza qual constituinte ou classe é o responsável pelas atividades terapêuticas. É necessário avaliar através de ensaios biomonitorados a eficácia dessa nova espécie, em relação ao efeito sedativo, bem como em relação à toxicologia da mesma.

## **Desenvolvimento da formulação**

Os dados obtidos nos ensaios efetuados durante a elaboração da formulação proposta atestaram a instabilidade da mesma. No desenvolvimento de fitoterápicos são necessários atender tanto as exigências da legislação pertinente, quanto os da tecnologia farmacêutica, tornando-se indispensável a garantia da qualidade em todas as etapas do processo, visando a obtenção de um medicamento eficaz, seguro e estável. Esses resultados estimulam a pesquisa de novas formas farmacêuticas para a incorporação da tintura de *Passiflora* ou alternativas que possam aproveitar o potencial terapêutico do maracujá, levando-se em consideração a necessidade do estabelecimento de parâmetros mais restritos de temperatura, umidade e estocagem.

## REFERÊNCIAS

---

AHN, H. J.; KIM, K. M.; KIM, C. K. Enhancement of bioavailability of ketoprofen using dry elixir as a novel dosage form. **Drug. Dev. Ind. Pharm.**, New York, v. 24, n. 7, p. 697-701, 1998.

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas e farmacológicas**. Buenos Aires: ISIS, 1998.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR, L. V. **Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000. 568 p.

ALLEN JUNIOR, L. V. **The art, science and technology of pharmaceutical compounding**. Washington: American Pharmaceutical Association, 1997, 319p.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução – RDC n( 17, de 24 de fevereiro de 2000.

AOYAGI, N.; KIMURA, R.; MURATA, T. Studies on *Passiflora incarnata* L. dry extract. L. Isolation of maltol and pharmacological action of maltol and ethyl maltol. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 22, n. 5, p. 1008-13, 1974.

BAIRD, R. M. Microbial contamination of cosmetic products. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v. 28, p. 17-20, 1977.

BALBACHAS, A. **As plantas curam**. 6. ed. São Paulo: Editora Missionária "A Verdade Presente", 1957.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Editora Universitária de São Paulo, 1978. v. 1.

BENNATI, E. Determinazione quantitativa dell'armina nell'estratto di *Passiflora incarnata*. **Boll. Chim. Farm.**, v. 110, p. 664-669, 1971.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**, Ames: Iowa State University Press, 1976.

BOKSTALLER, S.; SCHMIDT, P. C. A comparative study on the content of passionflower flavonoids and sesquiterpenes from valerian root extracts in pharmaceutical preparations by HPLC. **Pharmazie**, Berlin, v. 52, n. 7, p. 552-7, 1997.

BORRELI, F. et al. Antiinflammatory activity of *Passiflora incarnata* L. in rats. **Phytotherapy Research**, London, v. 10, n. 1, p. 104-6, 1996.



BHP- **British herbal pharmacopoeia**. London: Scientific Committee, 1983.

BROWN, K. R. et al. Theophylline elixir, moxolactan and a disulfiran reaction. **Ann. Intern. Med.**, v. 10, p. 621-622, 1982.

BROWN, R. T.; JIANLI, L.; SANTOS, C. A. M. Biogenetically patterned synthesis of camptothecin and 20- deoxycamptothecin. **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 859-862, 2000.

BURLESON, W. R.; MANTLO, I. J.; SELF, T. H.; RYAN, M. R. Taste preference test for oral liquid theophylline preparations. **Am. J. Hosp. Pharm.**, v. 35, n. 5, p. 584-586, 1978.

CERVI, A. C. **Revisão do gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) do estado do Paraná – Brasil**. Barcelona, 1981. Tese (Doutorado em Biologia), Facultad de Biologia, Universidad de Barcelona.

CHIU, C. P.; CHEN, B. H. Stability of heterocyclic amines during heating. **Food Chemistry**, v. 68, p. 267-272, 2000.

CORDELL, G. A. **Introduction to alkaloids**. United States of America: John Wiley & Sons, 1981.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. p. 108, v. 5.

COSTA, A. F. **Farmacognosia: Farmacognosia experimental**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000. 992 p. v. 3.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2. ed. New York: The New York Botanical Garden, 1988.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal: parte I – Células e tecidos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1986. 304 p.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal: parte II – órgãos – experimentos e interpretação**. São Paulo: Roca, 1987. 336 p.

DELLA LOGGIA, R. **Piante officinali per infusi e tisane**. Milano: Organizzazione Editoriale Medico Farmaceutica, 1993, p. 363-365.

DEVI, P. N.; RAO, Y. N. Solubilization of ibuprofen by using cosolvents, surfactants and formulation of an elixir and injectable preparation. **East. Pharm.**, v. 38, p. 137-140, 1995.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: A Biosynthetic approach**. London: John Wiley & Sons, 1998, 466 p.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78. p. 165-170, 2001.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: Arte e ciência**. Um guia de estudo Interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual, 1996. 230 p.

DUKE, J. A. **The Green Pharmacy**. Emmaus: Rodale Press, 1997. p. 353-354.

EAMES, A. J.; MacDANIELS, L. H. **An introduction to plant anatomy**. 2. ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1947. 427 p.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na atenção primária à saúde**. Londres: Manole, 2001.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS/Ed.da UFSC, 1999. p. 87-99.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: E. Blücher, 1990. 293 p.

EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14 ed. London: Saunders Company Limited, 1996.

FAHN, A. **Plant anatomy**. Oxford: Pergamon Press, 1982. 544 p.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS/Ed.da UFSC, 1999. p.163-181.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Simões et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS/Ed.da UFSC, 1999. p. 197-220.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2. ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

FARMACOPÉIA brasileira. 3. ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977.

FARMACOPÉIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FELLOWS, E. J.; SMITH, C. S. The chemistry of *Passiflora incarnata*. **Journal American Pharmaceutical Association**, v. 27, p. 574-6, 1938.

FISCHER, A. A.; PURCELL, P.; LE COUTEUR, D. G. Toxicity of *Passiflora incarnata* L. **Clinical Toxicology**, New York, v. 38, n. 1, p. 63-66, 2000.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949.

FREITAS, P. C. D. **Estudo Farmacognóstico comparativo de Espécies Brasileiras do Gênero *Passiflora* L.** São Paulo, 1985. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

GARCIA, A. A. et al. **Fitoterapia: Vandemecum de Prescripción**. 3. ed. [Barcelona]: Masson, 2000.

GEIGER, H.; MARKHAM, K. R. The C-glycosylflavone pattern of *Passiflora incarnata* L. **Zeitschrift-fur-Naturforschung Section C**, Berlin, v. 41, n. 9/10, p. 949-50, 1986.

GENNARO, A. R. **Remington: The science and practice of pharmacy**. 19. ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995. v. 2, 1934 p.

GIAVINA-BIANCHI JUNIOR, P. F. et al. Occupational respiratory allergic disease induced by *Passiflora alata* and *Rhamnus purshiana*. **Annals Allergy Asthma Immunology**. v. 79, 449-454, 1997.

GRAÇA, G. M. F. **Fitoterapia: uma proposta a nível de cuidados primários de saúde em Curitiba**. Curitiba: 1987, 56 p.

GRIEVE, M ; LEYEL, C. F. **A modern herbal**. London: Tiger Books International, 1994.

HADDAD, A. et al. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. S.1, Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1989.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H. **Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants**. London: Taylor & Francis, 1995.

HARVEY, G.; ROBSON, W. The synthesis of r-6-methoxytryptophan and of harmine, with a note on the action of acetaldeyde on tryptophan. **J. Chem. Soc.**,p.97-101, 1938.

HELOU, J. H. Preparações farmacêuticas obtidas por extração. **Rev. Bras. Farmacogn.**, São Paulo, v. 2/4, p. 106-109, 1987/1989.

HERBERT, R. B.; MANN, J. The biosynthesis of the  $\beta$ -carboline alkaloids, harman and eleagnine. **J. Chem. Soc.**, p. 1523-1525, 1982.

HOCHSTEIN, F, A.; PARADIES, A. M. Alkaloids of *Banisteria caapi* and *Prestonia amazonicum*. **Journal of the American Chemical |Society**, v. 79, n. 21-24, 1957.

JATO, J. L. V. **Tecnologia farmacêutica**: volume II – formas farmacêuticas. Spain: Editorial Síntesis, 2000.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw hill Book, 1940.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 7. ed. São Paulo: Nacional, 1985. p. 478-482.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 12. ed. São Paulo: Nacional, 1998.

JUNIPER, B. E.; JEFFREE, C. E. **Plant surfaces**. London: Edward Arnold, 1983. 93 p.

KIMURA, R. et al. Central depressant effects of maltol analogs in mice. **Chem. Pharm. Bull.** , v. 28, p. 2570-79, 1980.

KING, C. K.; YOON, Y. S.; KONG, J. Y. Preparation and evaluation of flurbiprofen dry elixir as a novel dosage form using a spray-drying technique. **Int. J. Pharm.** , v. 120, n. 16, p. 21-31, 1995.

KRUGER, A. **Herbs**: their medicine and magic. London: Parkgate Books, 1992.

LACHMAN, L. ; LIEBERMAN, H. A. ; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**, Lisboa: Fundação Calouste, 2001, v. 2. 1517 p.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS/Ed.da UFSC, 1999. P. 181-196.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. London: Heyden & Son, 1989. 373 p.

LUTOMSKI, J. Qualitative and quantitative chromatographic investigations of alkaloids of *Passiflora incarnata*. **Biul. Inst. Roslin Lecznichych**, v. 5, p. 182-198, 1959.

LUTOMSKI, J. Isolation of the major alkaloids from *Passiflora incarnata*. **Biul. Inst. Roslin Lecznichych**, v. 6, p. 209-219, 1960.

LUTOMSKI, J.; WROCINSKI, T. Pharmacodynamic properties of *P. incarnata* preparations. The effect of alkaloid and flavonoid components on pharmacodynamic properties of the raw materials. **Biul. Inst. Roslin Lecznichych**, v. 6, n. 2, p. 176-84, 1960.

LUTOMSKI, J. et al. Simple e alkaloids. I. Thin-layer chromatography of harman alkaloids occurring in plant material and in preparations. **Herba Pol.** Poznan, v. 13, n. 1-2, p. 44-52, 1967.

LUTOMSKI, J.; ADAMSKA, M.; JARUZELSKI, M. Simple carboline alkaloids. V. Comparative analysis of the basic components of *Passiflora incarnata* grown in greenhouses and open fields. **Herba Pol.** Poznan, v. 14, n. 3, p. 139-147, 1968.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Pharmakochemische untersuchungen von drogen der gattung *Passiflora* L. 3. Mitteilung: Phytochemische forschung der drogen aus *Passiflora edulis* Sims. Forma *flavicarpa*. **Planta Médica**, Stuttgart, v. 27, n. 3, p. 222-5, 1975.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Phytochemical studies of drugs from *Passiflora edulis* Sims. Forma *flavicarpa*. **Herba Hungarica**, v. 15, n. 2, p. 7-11, 1976.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. New York: Academic Press, 1982. 113 p.

MAUSETH, J. D. **Plant anatomy**. Menlo Park: Benjamin Cummings, 1988. p. 171-181.

MENGHINI, A.; MANCINI, L. A. TLC determination of flavonoid accumulation in clonal populations of *Passiflora incarnata* L. **Pharmacological Research Communications**, v. 20, n. 5, p. 113-6, 1988.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of Dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy mith notes on economic uses**. Oxford: Claredon Press, 1950. v. 1.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of Dicotyledons**. 2. ed. Oxford: Claredon Press, 1988. v. 1. 276 p.

MILLS, S.; BONE, K. **Principles and practice of phytotherapy**. China: Churchill Livingstone, 2000. p. 233.

MORAES, M. L. L. **Extração e análise de flavonóides em espécies brasileiras de *Passiflora* L.** São Carlos, 1995. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos.

NEUGEBAUER, H. Investigation of *Passiflora* constituent having sedative properties. **Pharmazie**, Berlin, v. 4, 17 p, 1949.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **A guide for health care professionals**. London: The Pharmaceutical Press, 1996. 296 p.

NORIYASU, H. et al. Structures of mutagens produced by the co-mutagen norharman with *o*- and *m*-toluidine isomers. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 493, n. 1-2, p. 115-126, 2001.

NUDELMAN, N. S. Estabilidade de produtos farmacêuticos. **Farmaco Ed. Prat.**, v. 26, n. 3, p. 205-223, 1971.

O'CONNELL, F. D.; LYNN, E. V. The alkaloid of *Banisteropsis inebrians* morton. **J. Am. Pharm. Assoc.**, v. 42, n. 12, 1953.

OGA, S.; FREITAS, P. C. ; SILVA, A, C. G. ; HANADA, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Médica**, Stuttgart, v. 50, n. 4, p. 303-6, 1984.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu, 1998. 263 p.

ORTEGA, G. G. et al. Brasilianische Phytotherapeutika. In: SOUZA, K. C. B. **Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa***. Porto Alegre, 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

OSAWA, T. Antioxidantes vegetais: papel protetor contra espécies reativas de oxigênio. **Cosmetic. Toiletries**, v. 7, mar/abr, p. 38-43, 1995.

PALMIERI, M. J. FDA methodology for the microbiological analysis of cosmetics and topical drugs. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v. 34, p. 35-39, 1983.

PHARMACOPOEA Helvetica. 7. ed. Berne: Departement Fédéral de l'Intérieur, 1995.

PASTENE, E.; MONTES, M.; VEJA, M. New HPTLC method for quantitative analysis of flavonoids of *Passiflora coerulea* L. **Journal of Planar Chromatography**, Heidelberg, v. 10, n. 4, p. 362-7, 1997.

PDR for herbal medicines. 2. ed. Montvale: Medical Economics Company, 2000.

PENSO, G. **Piante medicinale nella cosmetica**. 2 ed. Milano: Medico Farmaceutica, 1992, p. 99-207.

PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander , *P. edulis* Sims. e *Passiflora incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2000.

PETRY, R. D. et al. Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcoólicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmácia**. Porto Alegre, v. 79, n. 1-2, p. 7-10. 1998.

PETRY, R. D. et al. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, p. 162-164, 2001.

POINDEXTER, E. H.; CARPENTER, R. D. Isolation of harmane and norharmane from cigarette smoke. **Chemistry and Industry**, London, jan., 1962.



PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. **Técnica farmacêutica e farmácia galénica**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990. v. 2, 602 p.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. **Técnica farmacêutica e farmácia galénica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1992. v. 1, 1134 p.

QIMIN, L. et al. Mass spectral characterization of C-glycosidic flavonoids isolated from a medicinal plant (*Passiflora incarnata*). **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 562, n. 1-2, p. 435-46, 1991.

REHWALD, A.; MEIER, B.; STICHER, O. Qualitative and quantitative reversed-phase high performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* L. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 69, n. 3, p. 153-8, 1994.

REHWALD, A.; STICHER, O.; MEIER, B. Trace analysis of Harman alkaloids in *Passiflora incarnata* by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 6, n. 2, p. 96-100, 1995.

REIS, M. S. Manejo sustentado de plantas medicinais em ecossistemas tropicais. In: Di STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. p. 199-215.

REIS, M. S.; MARIOT, A. M. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS/Ed.da UFSC, 1999. p. 39-60.

ROMMELSPACHER, H. et al. 1-Methyl-beta-carboline (harmana), a potent endogenous inhibitor of benzodiazepine receptor-binding. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, Leipzig, v. 314, n. 1, p. 97-100, 1980.

ROESER, K. R. Die nadel der schwarzkiefer-massenprodukt und kunstwerk der natur. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1962.

RUGGY, G. H. ; SMITH, C. S. A pharmacological study of the active principle of *Passiflora incarnata*. **Journal American Pharmaceutical Association**, v. 29, p. 245-9, 1940.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: Iowa State College, 1951.

SATO, M. E. O. **Estudo da estabilidade de uma formulação na forma gel, veiculando o extrato fluido de *Casearia sylvestris* Sw., Flacourtiaceae (guaçatonga)**. São Paulo, 1998. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

SCAVONE, O.; PANIZZA, S. Aspectos botânicos e medicinais de plantas usadas como tranquilizante, destacando-se as nativas do Brasil. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, v. 18, n. 2, p. 185-197, 1978.

SCHILCHER, H. Zur Kenntnis der Flavon C-glykoside in *Passiflora incarnata* L. **Zeitschrift-fur-Naturforschung B**, Berlin, v. 23, n. 10, p. 1393, 1968.

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P.; CULVER, A. Estabilidade : testar ou não testar. **Cosmetic. Toiletries**, São Paulo, v. 5, n. 11, p. 35-39, 1993.

SCHÜLER, E. **Fitoterapia**, 2. ed. São Leopoldo: Pallotti, 1987.

SKOG, K.; SOLYAKOV, M.; JÄGERSTAD, M. Effects of heating conditions and additives on the formation of heterocyclic amines with reference to amino-carbolines in a meat juice model system. **Food Chemistry**, v. 68, p. 299-308, 2000.

SHI, Chuen-Chao. et al. Vasorelaxant effect of harman. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 390, p. 319-325, 2000.

SILVA, R. A. D. **Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Nacional, 1929

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS/Ed.da UFSC, 1999. 821 p.

SINGER, S. The use of preservative neutralizers in diluents and plating media. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v. 102, n. 12, p. 55-60, 1987.

SLAYTOR, M.; McFARLANE, I. J. The biosynthesis and metabolism of harman in *Passiflora edulis* **Phytochemistry**, v. 7, p. 1-4, 1968.

SLIGO, J. H.; CHARLES, B. G.; RAVENSCROFT, P. J. Oral bioavailability of theophylline from hydroalcoholic and alcohol free preparations. **Med. J. Aust.**, v. 2, p. 410-411, 1982.

SMITH, G. W.; CHALMERS, T. M.; NUKI, G. Vasculitis associated with herbal preparation containing *Passiflora* extract. **British Journal of Rheumatology**, London, v. 32, n. 1, p. 87-88, 1992.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS/Ed.da UFSC, 1999. p. 221-258.

SOUZA, K. C. B. de; ORTEGA, G. G. Padronização e estudo preliminar da estabilidade de extratos hidroalcoólicos de *Passiflora edulis* Sims. (maracujá). **Caderno de Farmácia**. Porto Alegre, v. 13, n. 2, p. 147-148, 1997.

SOUZA, K. C. B. **Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa***. Porto Alegre, 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SOULIMANI, R. et al. Behavioural effects of *Pasiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, n. 1, p. 11-20, 1997.

SOUZA, W., **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1989. v. 1.

SPERONI, E.; MINGHETTI, A. Neuropharmacological activity of extracts from *Passiflora incarnata*. **Planta Médica**, Stuttgart, v. 54, n. 6, p. 488-91, 1988.

SUGIMURA, T.; NAGAO, M. Mutagenic factors in cooked foods. **Rev. Toxicol.**, v. 6, n. 3, aug. p. 189-209, 1979.

THEODOSSIOU, P. Chromatographic analysis of galenics of *Passiflora*. **Trav. Soc. Pharm. Montpellier**. v. 25, n. 1, p. 43-46, 1965.

TSUCHIYA, H.; SHIMIZU, H.; IINUMA, M. Beta-carboline alkaloids in crude drugs. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 47, n. 3, p. 440-443, 1999.

USP. The United States Pharmacopoea. 24 ed. The National Formulary. 19 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2000. p. 2128.

WADE, A.; WELLER, P. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 2. ed. London: The Pharmaceutical Press, 1994, 651 p.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**. 2. ed. Germany: Springer, 1996. 384 p.

WAX, P. M. Elixir, diluents, and the passage of the 1938 Federal Food, Drug and Cosmetic Act. **Ann. Intern. Med.**, v. 122, n. 15, p. 456-461, 1995.

WOLFMAN, C. et al. Possible anxiolytic effects of chrysyn, as central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. Fayetteville, v. 47, p. 1-4, 1994.

WHO. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneve: World Health Organization, 1998. 115 p.

YUKARI, T. et al. Quantification of the co-mutagenic  $\beta$ -carbolines, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods. **Cancer Letters**, Clare, v. 143, n. 2, p. 139-143, 1999.

ZANOLI, P.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. Behavioural characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. **Fitoterapia**, Milan, v. 71, n. 1, p. S117-123, 2000.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999. p. 489-516.